

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



## **Estudo das atividades biológicas da alga *Undaria pinnatifida***

Bernardo Faria Gonçalves Pimenta Pedro

**Mestrado em Bioquímica**  
Especialização em Bioquímica Médica

Dissertação orientada por:  
Professora Doutora Maria Luísa Mourato Oliveira Marques Serralheiro



## Agradecimentos

Em primeiro lugar, queria agradecer à minha orientadora, a professora doutora Maria Luísa Serralheiro por vários motivos. Por me ter dado a oportunidade de realizar a minha tese de mestrado no seu laboratório, por me ter acompanhado a cada passo estando sempre disponível para qualquer dúvida ou orientação que eu necessitasse, mas sobretudo pela boa disposição e paciência que teve comigo durante todo este processo. Muito obrigado!

Em segundo lugar, um agradecimento muito grande à pessoa que me orientou no laboratório no início e me deu todas as bases e conselhos para que eu conseguisse trabalhar autonomamente e com qualidade nos meus ensaios. Muito obrigado Rebeca por toda a tua paciência e dedicação!

Obrigado à Rita Guedes por toda a sua disponibilidade e trabalho na espectrometria de massa que será sempre para mim uma grande dor de cabeça.

Um agradecimento também à Professora Lia Ascensão por todo o seu trabalho e ajuda na microscopia eletrónica de varrimento.

Obrigado ao Professor Ricardo Melo por ter fornecido a alga que foi usada ao longo de todo o trabalho.

Obrigado à Professora Helena Gaspar por ter levado o poster do meu trabalho à conferência “*Algal Biomass, Biofuels and Bioproducts*” de 2019 nos Estados Unidos da América.

E agora, provavelmente a pessoa mais importante em todo este ano no qual realizei a minha tese de mestrado, o maior dos obrigados à Laura! Existe tanto por que agradecer. Obrigado por toda a paciência e boa vontade que tiveste comigo, assim como todas as milhares horas perdidas ao fazê-lo, quer seja a ajudar-me com possivelmente todos os ensaios que fiz nesta tese (e não foram poucos), quer seja por ouvires os meus desabafos aleatórios sobre a vida (que também não foram poucos). Mas quero agradecer sobretudo pelo companheirismo que tivemos ao longo de todo este ano. Todos os gelados que comemos, todas as idas ao McDonald’s ou ao 100 montaditos (nunca na minha vida vi alguém tão feliz por comer gordurices), todos os cafés, todas as conversas mais randoms que tivemos e algumas sérias no meio obviamente (só para variar um bocadinho), bem como todos os minutos de ódios partilhados que só nós entendemos. Honestamente foste uma grande parte que fez esta experiência valer mesmo a pena e estou muito feliz em ter vindo parar a este laboratório e te ter conhecido, pois criámos uma boa amizade da qual possivelmente nenhum de nós estava à espera. Como já te disse, és uma pessoa estranha e extremamente esquisita (achas que te digo isto para insultar quando é exatamente o oposto), mas é isso que te faz especial, nunca mudes. Obrigado por tudo!

Acho que também há que agradecer aos meus professores do colégio St. Peter’s School que foram sem dúvida os melhores professores que alguma vez tive, pois conseguiram despertar o meu interesse para esta área das ciências e, para além disso, fora das aulas são pessoas excelentes que me adoram tanto como eu os adoro! Estou-vos eternamente grato, em especial atenção ao professor José Henriques e ao professor Vasco!

Por último, e sem sombra de dúvida não menos importante, um enorme obrigado à minha família e aos meus amigos que sempre me apoiaram, encorajaram e acreditaram em mim, mesmo que eu por vezes não acreditasse. Tenho a melhor família e amigos do mundo e quem me conhece sabe o quanto eu os valorizo, vocês fazem a minha felicidade e estou-vos gratos de uma maneira que não pode simplesmente ser expressa em palavras.

Se me esqueci de alguém peço desculpa, mas deixo um agradecimento final a todas as pessoas que contribuíram de uma forma ou de outra para a minha vida e o meu percurso académico. Obrigado a todos!



## Resumo

Na atualidade, tem havido cada vez mais a procura por um estilo de vida saudável e grande parte dele advém da alimentação. Como tal, nesta área tem-se investigado os compostos que vários alimentos têm e os seus benefícios para a saúde, nomeadamente as algas. Estas têm sido estudadas devido às suas capacidades antioxidantes e anti-obesidade e é neste âmbito que se iniciou este trabalho experimental, centrado no estudo de *Undaria pinnatifida*.

Começou-se então por liofilizar a alga para obtermos o material inicial para desenvolver o trabalho. De seguida, efetuaram-se duas decocções, que permitiram a extração dos compostos de *U. pinnatifida* e a obtenção de extratos aquosos. A primeira durante 24 horas sob agitação à temperatura ambiente (W24) e a segunda durante 30 minutos a 100 ° C (W100). A ambas foi feita a precipitação de mucilagens, com o objetivo de obter um sobrenadante constituído maioritariamente por compostos fenólicos, obtendo-se assim um total de quatro extratos: cozida durante 30 minutos, com e sem mucilagens, e 24 horas sob agitação, a temperatura ambiente, com e sem mucilagens.

De seguida, determinaram-se as atividades biológicas destes quatro extratos tendo-se quantificado os fenóis totais, avaliado a capacidade de redução do radical DPPH e de inibição dos enzimas acetilcolinesterase e HMGR. Destes ensaios chegou-se à conclusão de que o melhor extrato é o da alga cozida durante 30 minutos, uma vez que apresenta uma maior capacidade de inibir ambos os enzimas em estudo e de reduzir o radical DPPH, mesmo apresentando uma menor quantidade de fenóis. Por último, observou-se o perfil de cada um dos extratos obtido através da análise por HPLC-DAD, de forma a tentar entender as diferenças de atividades, sendo que não foram encontradas diferenças significativas que justificassem os resultados obtidos. Deste modo, pode concluir-se que a qualidade dos compostos extraídos da alga cozida seriam superiores, explicando as melhores atividades.

O próximo passo consistiu em estudar que modificações ocorreriam nas algas quando sujeitas à digestão no nosso organismo. Para tal realizou-se uma digestão *in vitro* com suco gástrico e suco pancreático da alga liofilizada, retirando-se alíquotas às 0 e 4 horas, sendo também feita uma digestão de 24 horas para saber se era possível a extração de novos compostos (de um ponto de vista biotecnológico) e todas estas amostras foram para analisar no HPLC-DAD. Os cromatogramas foram esclarecedores mostrando que após a digestão de 4 horas não há muita alteração aos extratos. No entanto, no caso das 24 horas com suco pancreático (WDig), não só foram extraídos novos compostos como também em maior quantidade aqueles que já se encontravam presentes no extrato antes da digestão. Foram então determinadas as atividades biológicas deste extrato revelando que existe uma maior quantidade de fenóis totais, porém não se traduziu num aumento de bioatividade.

Por último, com os extratos que obtiveram melhores resultados, nomeadamente o da alga cozida durante 30 minutos e o da digestão de 24 horas com suco pancreático, realizou-se o LC-MS/MS com a finalidade de tentar identificar quais os compostos responsáveis pelas diferenças de atividades. Adicionalmente, para se tentar ver algumas diferenças morfológicas dos diferentes extratos, fez-se a microscopia eletrónica de varrimento.

Fechando o capítulo das bioatividades, passou-se ao estudo de *U. pinnatifida* com células cancerígenas do cólon (Caco-2) e com células cancerígenas do fígado (Hep-G2). Primeiramente, nas células Caco-2 foi medida a citotoxicidade dos extratos W100 e W24, com e sem mucilagens, nas concentrações de 0,1 e 0,5 mg/mL. Não foi revelada nenhuma atividade citotóxica nestas concentrações. Efetuou-se também a eletroforese bidimensional para observar as mudanças do perfil proteico, tendo-se estudado o extrato da alga liofilizada, W100 e WDig.

Por último, mediu-se novamente a citotoxicidade nas células Hep-G2 dos extratos W100 e WDig, nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,5 mg/mL. O extrato WDig foi mais citotóxico que W100,

com os respetivos valores de  $IC_{50}$  de 0,93 e 1,96 mg/mL. Por fim, efetuou-se uma eletroforese unidimensional para se entender também se existem modificações nos perfis proteicos das células quando em contacto com as amostras em estudo.

**Palavras-chave:** *Undaria pinnatifida*, atividades biológicas, digestão pancreática.

## Abstract

In recent years there's been a growing search for a healthy lifestyle and a big part of it comes from diet. As such, in this area several foods are being looked into for their compounds and related health benefits, namely algae. These have been studied because of their antioxidant and anti-obesity activities and it is with that goal in mind that this experimental work took place, focusing on the study of *Undaria pinnatifida*.

This work started with lyophilizing the algae in order to obtain the initial material. With this lyophilized algae decoctions were made, obtaining aqueous extracts. Two initial decoctions were done. One during 24 hours under agitation at room temperature (W24) and one cooked for 30 minutes (W100). To both mucilage precipitation was made with the objective of obtaining a supernatant comprised with a majority of phenolic compounds getting a total of four extracts: cooked algae for 30 minutes, with and without mucilage, and algae 24 hours under agitation at room temperature, also with and without mucilage.

Initially, the biological activities of all four extracts were determined, namely total phenol quantification, DPPH radical reduction capacity, acetylcholinesterase inhibition and HMGR inhibition. With this trials we came to the conclusion that the best extract was the cooked algae for 30 minutes since it had the highest inhibition of both acetylcholinesterase and HMGR, as well as highest DPPH reduction capacity with a lower total phenol quantity. Lastly, through HPLC-DAD analysis we observed the obtained profile of each extracts to try to comprehend the difference in activities. However no significant differences were found that justified the results. Consequently, the conclusion to take was that the quality of the compounds extracted from the cooked algae was superior, explaining the better bioactivities.

The next step was to study what happened to the algae when it was subjected to digestion in our organism. To such extent, digestion with gastric juice and with pancreatic juice of the lyophilized algae was done, taking aliquots at time 0, 4 hours and also 24 hours digestion was made to see if we could extract new compounds (from a biotechnological standpoint) and all were analysed by HPLC-DAD. The chromatograms were enlightening showing that after 4 hours digestion not much alterations occurred. However in the case of the 24 hours digestion with pancreatic juice (WDig), not only new compounds were extracted but also at larger quantity. The biological activities of this extract were then determined which pointed out an existing larger quantity of total phenols, yet it didn't manifest in an increase of bioactivity.

Finally, with the extracts that had the better results, namely the cooked algae and the digested 24 hours with pancreatic juice, LC-MS/MS was done with the intent of identifying which compounds were responsible for the differences in bioactivities. Additionally scanning electron microscopy was made of the different extracts to see if we could spot some morphological changes.

Closing the chapter of the biological activities we moved on to the study of *U. pinnatifida* with Caco-2 cells, which are colon carcinogenic cells that simulate the intestinal barrier, and with Hep-G2 cells, which are liver carcinogenic cells since this organ has a strong impact in the body's bioactivities.

Firstly, the cytotoxicity of the W100 and W24 extracts, with and without mucilage, was measured in the Caco-2 cells with the concentrations of 0,1 and 0,5 mg/mL. No cytotoxic activity was revealed at either concentration. We also did bidimensional electrophoresis to observe the change of the protein profile, having studied the lyophilized algae, W100 and WDig.

Moreover, we again measured the cytotoxicity in Hep-G2 cells of the W100 and WDig extracts at 0,1; 0,2 and 0,5 mg/mL concentrations. WDig was more cytotoxic than W100, with respective IC<sub>50</sub> values of 0,93 and 1,96 mg/mL. Lastly, another electrophoresis was done, this time one dimensional, to also better understand the differences in the protein profiles.

**Keywords:** *Undaria pinnatifida*, biological activities, pancreatic digestion.



# Índice

Agradecimentos.....	III
Resumo.....	V
Abstract .....	VII
Índice de Figuras .....	XI
Índice de Tabelas.....	XV
Lista de Abreviaturas e Siglas .....	XVII
1 - INTRODUÇÃO .....	1
1.1 – <i>Undaria pinnatifida</i> (Wakame).....	3
1.2 – Metabolitos secundários.....	4
1.2.1 – Polifenóis.....	5
1.2.2 – Florotaninos.....	6
1.2.3 – Fucoxantina .....	7
1.2.4 – Alginatos .....	7
1.3 – Mucilagens .....	8
1.4 – Atividades biológicas .....	8
1.4.1 – Atividade antioxidante .....	8
1.4.2 – Acetilcolinesterase.....	11
1.4.3 – HMG-CoA Redutase .....	13
1.5 – Colesterol .....	14
1.5.1 – Descrição, noções básicas e funções biológicas.....	14
1.5.2 – Doenças relacionadas com o colesterol.....	15
2 – OBJETIVOS .....	17
3 – PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	21
3.1 – Reagentes .....	23
3.2 – Equipamento .....	23
3.3 – Preparação da alga <i>U. pinnatifida</i> para extrações: processo de obtenção do pó da alga.....	24
3.3.1 – Extração a 100 °C durante 30 minutos de <i>U. pinnatifida</i> (W100).....	24
3.3.2 – Extração de 24 h sob agitação de <i>U. pinnatifida</i> (W24).....	24
3.3.3 – Precipitação das mucilagens.....	25
3.4 – Condições analíticas do HPLC-DAD.....	25
3.4.1 – Análise qualitativa do extrato aquoso de <i>U. pinnatifida</i> .....	25
3.5 – Condições analíticas do LC-MS.....	25
3.6 – Digestões de <i>U. pinnatifida</i> .....	26
3.6.1 – Digestão com suco gástrico.....	26
3.6.2 – Digestão com suco pancreático (WDig).....	27
3.7 – Quantificação dos fenóis totais .....	27

3.8 – Determinação da atividade antioxidante da <i>U. pinnatifida</i> .....	28
3.9 – Determinação da atividade enzimática da <i>U. pinnatifida</i> .....	29
3.9.1 – Inibição da acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7) .....	29
3.9.2 – Inibição da HMG-CoA Redutase (EC 1.1.1.34).....	30
3.10 – Análise por Microscopia Eletrônica de Varrimento .....	30
3.11 – Ensaio em linhas celulares do carcinoma do cólon.....	30
3.11.1– Determinação da citotoxicidade nas células Caco-2 .....	31
3.11.2– Estudos da influência do colesterol em células Caco-2.....	32
3.11.3– Eletroforese bidimensional.....	32
3.12 – Ensaio em linhas celulares do carcinoma do carcinoma hepatocelular .....	34
3.12.1– Determinação da citotoxicidade nas células Hep-G2 .....	34
3.12.2– Extração e quantificação proteica.....	34
3.12.3– Eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional .....	34
3.13 – Análise estatística .....	35
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	37
4.1 – Caracterização dos extratos de <i>U. pinnatifida</i> por HPLC-DAD.....	39
4.2 – Identificação de compostos de <i>U. pinnatifida</i> por LC-MS.....	45
4.3 – Quantificação dos fenóis totais .....	48
4.4 – Determinação da atividade antioxidante .....	49
4.4.1 – Capacidade de redução do radical DPPH.....	49
4.5 – Determinação da atividade enzimática.....	50
4.5.1 – Inibição da acetilcolinesterase .....	50
4.5.2 – Inibição da HMG-CoA Redutase .....	52
4.6 – Análise por Microscopia Eletrônica de Varrimento.....	53
4.7 – Ensaio em linhas celulares do carcinoma do colon humano .....	55
4.7.1 – Determinação da citotoxicidade em células Caco-2.....	55
4.7.2 – Eletroforese bidimensional.....	55
4.8 – Ensaio em linhas celulares do carcinoma hepatocelular humano.....	57
4.8.1 – Determinação da citotoxicidade em células Hep-G2 .....	57
4.8.2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional .....	58
4.9 – Discussão global .....	65
5 – CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	67
Referências Bibliográficas .....	71
Anexos.....	79

## Índice de Figuras

Figura 1.1 - Wakame ( <i>Undaria pinnatifida</i> ), colhida na ria do Estuário de Aveiro, Portugal. ....	3
Figura 1.2 - Classificação dos polifenóis e das seis maiores subclasses de taninos na alga, os florotaninos, adaptado de <sup>16</sup> . ....	5
Figura 1.3 - Estrutura química dos principais florotaninos, adaptado de <sup>16</sup> . ....	6
Figura 1.4 - Estrutura química da fucoxantina, adaptado de <sup>25</sup> . ....	7
Figura 1.5 - Representação esquemática da estrutura química dos principais antioxidantes endógenos e exógenos, adaptado de <sup>51</sup> . ....	10
Figura 1.6 - Representação esquemática dos locais de ligação da AChE, adaptado de <sup>52</sup> . ....	11
Figura 1.7 - Mecanismo de ação da AChE na neurotransmissão, adaptado de <sup>52</sup> . ....	12
Figura 1.8 - Reação de hidrólise do éster da acetilcolina catalisada pelo enzima acetilcolinesterase, dando origem a colina e ácido acético <sup>52</sup> . ....	13
Figura 3.1 – Reação do ácido gálico com o molibdénio (componente do reagente de Folin-Ciocalteu), adaptado de <sup>82</sup> . ....	27
Figura 3.2 – Princípio do teste da capacidade de redução do radical livre DPPH na presença de uma amostra com propriedades antioxidantes, adaptado de <sup>85</sup> . ....	28
Figura 3.4 – Esquema representativo da reação do método de Ellman para determinação da atividade do enzima AChE, adaptado de <sup>86</sup> . ....	29
Figura 3.4 – Representação esquemática da reação enzimática da HMGR, adaptado de <sup>91</sup> . ....	30
Figura 3.5 – Estruturas químicas do MTT e do seu produto reduzido formazan, adaptado de <sup>92</sup> . ....	31
Figura 4.1 – Cromatograma de HPLC-DAD dos extratos W100 e W24, na concentração de 1 mg/mL. ....	39
Figura 4.2 – Cromatograma de HPLC-DAD do extrato da alga W24 com mucilagens e W24 sem mucilagens, na concentração de 5 mg/mL. ....	40
Figura 4.3 – Cromatograma de HPLC-DAD do extrato W100 com mucilagens e W100 sem mucilagens, na concentração de 5 mg/mL. ....	40
Figura 4.4 – Comparação da intensidade da absorvência obtida aos diversos tempos de retenção para o extrato de <i>U. pinnatifida</i> W100, W100 sem mucilagens, W24 e W24 sem mucilagens, a uma concentração de 5 mg/mL. ....	41
Figura 4.5 – Cromatograma de HPLC-DAD do extrato da alga <i>U. pinnatifida</i> quando efetuada a digestão gástrica (com pepsina) aos tempos 0, 4 e 24 horas, na concentração de 5 mg/mL. ....	42
Figura 4.6 – Cromatograma de HPLC-DAD do extrato da alga <i>U. pinnatifida</i> quando efetuada a digestão pancreática (com pancreatina) aos tempos 0, 4 e 24 horas, na concentração de 5 mg/mL. ....	43
Figura 4.7 – Comparação da intensidade da absorvência obtida a diversos tempos de retenção para a <i>U. pinnatifida</i> digerida 4 horas com pepsina, 24 horas com pepsina, 4 horas com pancreatina e 24 horas com pancreatina, a uma concentração de 1 mg/mL. ....	44
Figura 4.8 – Cromatograma de HPLC-DAD do extrato da alga <i>U. pinnatifida</i> quando efetuada a digestão pancreática aos tempos 0,24, 48, 72 e 96 horas, na concentração de 1 mg/mL. ....	44

Figura 4.9 – Cromatogramas do pico base do WDig obtidos por ESI em modo negativo (vermelho) e positivo (azul).....	45
Figura 4.10 – Cromatogramas do pico base do WDig (azul) e do W100 (vermelho) obtidos por ESI em modo negativo (a) e positivo (b). ....	46
Figura 4.11 – Cromatogramas do pico base do WDig no ensaio LC-ESI(+)-MS/MS (vermelho) e LC-ESI(-)-MS/MS (verde). ....	46
Figura 4.12 - Comparação da quantidade dos fenóis totais dos diferentes extratos. Para cada valor, letras diferentes dizem respeito a amostras estatisticamente diferentes, com nível de confiança de 95 %.....	48
Figura 4.13 - Comparação das percentagens de captura do radical DPPH a uma concentração final de 0,1 mg/mL dos extratos. O padrão comercial quercetina apresenta um $EC_{50}$ (mg/mL) de $0,003 \pm 0,21$ . Para cada valor, letras diferentes dizem respeito a amostras estatisticamente diferentes, com nível de confiança de 95 %. ....	49
Figura 4.14 - Comparação dos valores obtidos da inibição da atividade enzimática dos diferentes extratos a uma concentração final de 1 mg/mL. O padrão comercial galantamina apresenta um $IC_{50}$ (mg/mL) de $0,0003 \pm 0,008$ . Para cada valor, letras diferentes dizem respeito a amostras estatisticamente diferentes, com nível de confiança de 95 %.....	51
Figura 4.15 - Comparação dos valores obtidos de inibição da HMGR para os diferentes extratos a uma concentração final de 1 mg/mL. O padrão comercial sinvastatina apresenta um $IC_{50}$ (mg/mL) de $0,0002^{90}$ . Para cada valor, letras diferentes dizem respeito a amostras estatisticamente diferentes, com nível de confiança de 95 %.....	52
Figura 4.16 – Imagem do SEM da estrutura inicial da alga liofilizada. ....	53
Figura 4.17 – Imagem do SEM do extrato W100. ....	53
Figura 4.18 – Imagem do SEM do extrato W100 sem mucilagens.....	54
Figura 4.19 – Imagem do SEM do extrato WDig. ....	54
Figura 4.20 – (a) Imagem do gel de eletroforese bidimensional das células Caco-2 com colesterol; (b) Imagem do gel de eletroforese bidimensional das células Caco-2 com colesterol + ezetimiba.....	56
Figura 4.21 – (c) Imagem do gel de eletroforese bidimensional das células Caco-2 com colesterol + alga liofilizada; (d) Imagem do gel de eletroforese bidimensional das células Caco-2 com colesterol + WDig.....	56
Figura 4.22 – (e) Imagem do gel de eletroforese bidimensional das células Caco-2 com colesterol + W100; (f) Imagem do gel de eletroforese bidimensional das células Caco-2 com colesterol + ezetimiba + W100.....	57
Figura 4.23 – Valores de $IC_{50}$ para os extratos em estudo. Para cada valor, letras diferentes dizem respeito a amostras estatisticamente diferentes, com nível de confiança de 95 %. ....	58
Figura 4.24 – Análise eletroforética desnaturante (SDS-PAGE), normalizada pela quantidade das proteínas totais de células Hep-G2: M – Marcador de peso molecular; C 4 h e C 24 h – Expressão proteica das células expostas apenas a meio de cultura durante 4 e 24 horas, respetivamente; W100 4 h e W100 24 h – Expressão proteica das células expostas ao extrato W100 durante 4 e 24 horas, respetivamente; WDig 4 h e WDig 24 h – Expressão proteica das células expostas ao extrato WDig 4 e 24 horas, respetivamente. ....	59

Figura 4.25 – Gráfico da intensidade ( <i>pixel</i> ) de cada banda obtida no gel de eletroforese, normalizado pela quantidade de proteína, em função da distância percorrida (cm) para as células controlo, em contacto com W100 e com WDig durante 4 horas.....	59
Figura 4.26 – Gráfico da intensidade ( <i>pixel</i> ) de cada banda obtida no gel de eletroforese, normalizado pela quantidade de proteína, em função da distância percorrida (cm) para as células controlo, em contacto com W100 e com WDig durante 24 horas.....	61
Figura 4.27 – Gráfico da intensidade ( <i>pixel</i> ) de cada banda obtida no gel de eletroforese, normalizado pela quantidade de proteína, em função da distância percorrida (cm) para as células controlo 4 e 24 horas. ....	62
Figura 4.28 – Gráfico da intensidade ( <i>pixel</i> ) de cada banda obtida no gel de eletroforese, normalizado pela quantidade de proteína, em função da distância percorrida (cm) para as células com o extrato W100 4 e 24 horas.....	63
Figura 4.29 – Gráfico da intensidade ( <i>pixel</i> ) de cada banda obtida no gel de eletroforese, normalizado pela quantidade de proteína, em função da distância percorrida (cm) para as células com o extrato WDig 4 e 24 horas.....	64



## Índice de Tabelas

Tabela 3.1 – Gradiente utilizado na análise das amostras por HPLC-DAD.....	25
Tabela 3.2 – Programa #3 da eletroforese para <i>strips</i> de 7 cm e pH 3-11.....	33
Tabela 3.3 – Protocolo de coloração dos géis de acrilamida com nitrato de prata.....	33
Tabela 4.1 –Proposta de identificação (modo ESI negativo) dos compostos maioritários presentes no extrato digerido de <i>U. pinnatifida</i> . ....	47
Tabela 4.2 - Valores da distância percorrida (cm), peso molecular (kDa) e da área das bandas correspondentes às proteínas das células em contacto com o meio (controlo), com W100 e com o WDig durante 4 horas.....	60
Tabela 4.3 - Valores da distância percorrida (cm), peso molecular (kDa) e da área das bandas correspondentes às proteínas das células em contacto com o meio (controlo), com W100 e com o WDig durante 24 horas.....	61
Tabela 4.4 - Valores da distância percorrida (cm), peso molecular (kDa) e da área das bandas correspondentes às proteínas das células em contacto com o meio (controlo) 4 e 24 horas. ....	62
Tabela 4.5 - Valores da distância percorrida (cm), peso molecular (kDa) e da área das bandas correspondentes às proteínas das células em contacto com o extrato W100 4 e 24 horas. ....	63
Tabela 4.6 - Valores da distância percorrida (cm), peso molecular (kDa) e da área das bandas correspondentes às proteínas das células em contacto com o extrato WDig 4 e 24 horas. ....	64





## Lista de Abreviaturas e Siglas

Abs	Absorvência
ABC	Do inglês <i>ATP-binding cassette</i>
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChI	Iodeto de acetiltiocolina
ACN	Acetonitrilo
BSA	Albumina de soro bovino, do inglês <i>bovine serum albumin</i>
CHAPS	3-[(3-Colamidopropil)dimetilamónio]-1-propano sulfato
Ch	Colina
ChAT	Colina-Acetiltransferase
ChE	Colinesterase
DA	Doença de Alzheimer
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DTT	Ditiotreitol
DTNB	5-5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico), do inglês <i>5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)</i>
EC <sub>50</sub>	Concentração eficaz (do inglês <i>effective concentration</i> ) que representa 50 % da extinção do radical
ESI	Ionização por eletrospray, do inglês <i>electrospray ionisation</i>
FBS	Soro bovino fetal, do inglês <i>fetal bovine serum</i>
FCR	Reagente de Folin-Ciocalteu, do inglês <i>Folin–Ciocalteu reagent</i>
GAE	Equivalentes de ácido gálico, do inglês <i>gallic acid equivalents</i>
HBSS	Do inglês <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
HDL	Lipoproteína de alta densidade, do inglês <i>high density lipoprotein</i>
HMG-CoA	3-Hidroxi-3-Metilglutaril Coenzima A
HMGR	HMG-CoA Redutase
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fotodíodos, do inglês <i>high performance liquid chromatography with diode array detector</i>
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória (do inglês <i>inhibitory concentration</i> ) que representa 50 % de inibição
IDL	Lipoproteínas de densidade intermédia, do inglês <i>intermediate density lipoproteins</i>
IMC	Índice de massa corporal
LC-MS <sup>n</sup>	Cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa <i>tandem</i>

LDL	Lipoproteína de baixa densidade, do inglês <i>low density lipoprotein</i>
LXR	Recetor X do fígado, do inglês <i>liver X receptor</i>
MC	Morte celular
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio, do inglês <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
MS	Espetrometria de massa, do inglês <i>mass spectrometry</i>
$m/z$	Razão massa/carga do ião
NADPH	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
NPC1L1	Niemann-Pick C1-Like 1
PBS	Tampão fosfato salino, do inglês <i>phosphate-buffered saline</i>
PM	Peso molecular
PSA	Persulfato de amónio
PPAR	Recetor do peroxissoma ativador da proliferação, do inglês <i>peroxisome proliferation activation receptor</i>
RNS	Espécies reativas de nitrogénio, do inglês <i>reactive nitrogen species</i>
ROS	Espécies reativas de oxigénio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio, do inglês <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SNP	Nitroprussiato de sódio
SREBP	Proteína de ligação ao estero, do inglês <i>sterol response element-binding protein</i>
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>
TEER	Resistência elétrica transepithelial, do inglês <i>transepithelial electrical resistance</i>
TEMED	Tetrametiletenodiamina
TFA	Ácido trifluoracético, do inglês <i>trifluoroacetic acid</i>
$t_R$	Tempo de retenção
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano, do inglês <i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane</i>
UV-Vis	Espetroscopia de ultravioleta-visível
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
W100	Liofilizado do sobrenadante da alga cozida durante 30 minutos
W24	Liofilizado do sobrenadante da alga sob agitação 24 horas à temperatura ambiente
WDig	Liofilizado do sobrenadante da alga digerida 24 horas com suco pancreático

# **1 - INTRODUÇÃO**



## 1.1 – *Undaria pinnatifida* (Wakame)

*Undaria pinnatifida* (*U. pinnatifida*), mais conhecida por Wakame (nome dado à alga processada que é usada na indústria alimentar), é um tipo de alga castanha que normalmente cresce nas águas do Japão <sup>1</sup> (Figura 1.1). As algas marinhas, também conhecidas como macroalgas, são um grupo extenso dos organismos macroscópicos que fazem parte de uns milhares de espécies do ecossistema marinho. As algas marinhas são divididas em três principais Filo de acordo com a sua cor: *Chlorophyta* (algas verdes), *Rhodophyta* (algas vermelhas) e *Phaeophyta* (algas castanhas). As cores das algas marinhas estão relacionadas com os pigmentos, sendo a clorofila o pigmento associado à cor das algas verdes, a ficobilina à das algas vermelhas e a fucoxantina à das algas castanhas <sup>2</sup>.



**Figura 1.1** - Wakame (*Undaria pinnatifida*), colhida na ria do Estuário de Aveiro, Portugal.

As algas têm sido consumidas como vegetais marinhos em países asiáticos durante milhares de anos e são tradicionalmente distinguidas pelos seus benefícios para a saúde. Em particular, a *U. pinnatifida* é uma das algas castanhas mais amplamente consumidas no Japão. Nos últimos 20 anos, o consumo de algas tem diminuído à medida que os produtos lácteos e a carne foram introduzidos na alimentação. Tal mudança nos hábitos alimentares resultou no aumento da incidência de doenças, tais como a hiperlipidémia, arteriosclerose e doença coronária. No caso da hiperlipidémia, que é também um sintoma preliminar da arteriosclerose e da doença cardiovascular, registou-se um aumento significativo. Por essa mesma razão, a procura de alimentos eficazes no tratamento desta patologia é de elevada importância <sup>3</sup>.

As algas marinhas são ricas em polissacáridos, vitaminas, minerais e compostos bioativos, como polifenóis, proteínas, lípidos e carotenoides que possuem funções relevantes, nomeadamente antioxidação, antibacteriana, antiviral, entre outras. Em resposta à procura da sociedade de um estilo de vida saudável e de uma maior longevidade, tem existido um maior interesse no que toca ao consumo de comidas funcionais, isto é, ricas em compostos naturais bioativos. Recentemente tem-se descoberto que este tipo de produtos marinhos possui potencial nestes compostos, especialmente, nos antioxidantes <sup>4</sup>. Atualmente, tem havido um aumento da preocupação com a segurança dos antioxidantes sintéticos e tem-se tornado cada vez mais uma tendência o uso de alimentos orgânicos e naturais. Como tal, tem-se procurado substituir os compostos sintéticos que atuam como aditivos alimentares por antioxidantes naturais. Estes antioxidantes naturais derivados de várias plantas e algas marinhas têm mostrado grande potencial, não só em estabilizar a oxidação dos produtos alimentares, bem como tendo uma gama de benefícios para a saúde. Os antioxidantes são responsáveis pela prevenção dos danos celulares causados pelos radicais livres, os quais causam dano e morte celular, induzindo diferentes tipos de doenças crónicas, como por exemplo o cancro e a aterosclerose. A

ingestão apropriada de antioxidantes naturais é sugerida desempenhar um papel importante na melhoria das defesas do corpo e na prevenção de doenças relacionadas com a formação destas espécies reativas de oxigénio (ROS), isto é, do foro inflamatório, entre outros <sup>4,5</sup>.

## 1.2 – Metabolitos secundários

As algas marinhas fazem parte da dieta humana asiática e são conhecidas pela sua variedade de benefícios. São altamente nutritivas devido ao seu elevado conteúdo em fibra, minerais e ácidos gordos polinsaturados <sup>6</sup>. Para além de serem uma boa fonte de proteínas e vitaminas, também contêm uma larga gama de metabolitos secundários com valiosas atividades biológicas, as quais não se encontram em plantas do solo, e que podem desempenhar um papel relevante na prevenção e tratamento de doenças crónicas. Estudos epidemiológicos têm mostrado haver uma associação entre a toma dietética de algas marinhas e a redução da prevalência de doenças crónicas, tais como a doença cardiovascular, hiperlipidémia e cancro <sup>7</sup>.

Num estudo com a toma da alga marinha castanha *U. pinnatifida*, foram mostrados efeitos positivos no ganho de peso corporal, consumo energético, níveis séricos de glucose e insulina em ratinhos obesos induzidos pela dieta. Para além disso, houve uma diminuição da expressão do marcador de inflamação, interleucina 6 (IL-6), um aumento do gasto energético e uma diminuição da lipogénese. Os autores sugeriram que a redução da massa corporal não se deve exclusivamente à fucoxantina, porém também a outros componentes da alga, tais como o ácido eicosapentanoico e a fibra <sup>8</sup>. É também sugerido noutro ensaio que a ingestão dietética de *U. pinnatifida* reduz a pressão arterial em humanos. Não esquecer que a alga contém largas quantidades de alginato e minerais, sendo que foram demonstrados terem a capacidade de reduzir a pressão arterial <sup>9</sup>.

Uma série de compostos antioxidantes potentes foram isolados e identificados em diferentes tipos de algas, incluindo florotaninos, polissacáridos sulfatados, pigmentos carotenoides (como a fucoxantina) e esteróis. As atividades antioxidantes fortes das algas estão presentes como mecanismos de proteção química. As macroalgas são frequentemente expostas a uma combinação de luz forte e concentrações de oxigénio elevadas, ambas levando à formação de ROS e outros agentes oxidantes. Contudo, o dano aos componentes estruturais (ácidos gordos polinsaturados) ou qualquer outro dano sério fotodinâmico à alga raramente ocorre. Para conseguir sobreviver a estes difíceis ambientes, as algas desenvolveram um potente sistema de proteção antioxidante que consiste numa gama de compostos antioxidantes que poderão trabalhar sinergicamente para limitar a oxidação. Estudos demonstraram que as algas castanhas têm uma capacidade de antioxidação superior à das algas verdes e vermelhas <sup>10</sup>. Os florotaninos são o único grupo de taninos presente na alga castanha, os quais têm mostrado ter efeitos protetores contra o peróxido de hidrogénio originado pelo dano celular, atuando como captadores de radicais livres, agentes redutores e quelantes de metais. Outro composto importante é a fucoxantina, o carotenoide dominante das algas castanhas, que tem atraído alguma atenção como resultado das suas propriedades antioxidantes que mostraram possuir efeitos anticancerígenos, anti-obesidade e anti-inflamatórios significativos. A fucoxantina na sua forma pura é vulnerável à oxidação. Não obstante, foi encontrada razoavelmente estável na presença de antioxidantes coexistentes na alga, tais como polifenóis <sup>11</sup>.

### 1.2.1 – Polifenóis

Os polifenóis são um grupo de compostos heterogêneo e o maior grupo de fitoquímicos encontrados na dieta humana, incluindo em fruta, vegetais, sementes, óleos essenciais e noutros alimentos e bebidas. Estes metabolitos secundários das plantas contêm inúmeras estruturas fenólicas e diferem estruturalmente desde moléculas simples a compostos altamente polimerizados. A família dos polifenóis pode ser classificada de acordo com a sua origem, função biológica e estrutura química. Para simplificar, e de acordo com a estrutura química das agliconas, os polifenóis podem ser categorizados em ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, linhanos e outros compostos fenólicos. Entre eles, os flavonoides são os mais amplamente distribuídos e podem ser divididos em seis subclasses: flavonoles, flavanoles, flavononas, flavonas, isoflavonas e antocianinas <sup>12</sup> (Figura 1.2). Estudos epidemiológicos, clínicos e nutricionais mostram que os polifenóis obtidos da dieta desempenham um papel importante na saúde humana. O seu consumo regular tem sido associado com um risco reduzido de diferentes doenças crónicas, incluindo o cancro, desordens metabólicas, doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas.

As algas marinhas são uma fonte rica de compostos polifenólicos. A maior proporção de compostos fenólicos encontrados nas algas verdes e vermelhas são os bromofenóis, ácidos fenólicos e flavonoides. Por outro lado, os florotaninos são o grupo polifenólico dominante de metabolitos secundários encontrado apenas nas algas castanhas <sup>13</sup>. Os florotaninos podem ser classificados em seis subclasses: “*eckols*”, “*fuhalols*”, “*fucophlorethols*”, “*phlorethols*”, “*fucols*” e “*isofuhalos*”. Sabe-se que existem em formas solúveis e ligadas à parede celular. São necessários para a integridade física da alga, estando também envolvidos num número de papéis secundários importantes. As algas castanhas produzem estes compostos para se protegerem a si mesmas contra herbívoros e em condições de stress, minimizando o dano oxidativo causado pela falta de nutrientes e radiação ultravioleta, entre outros <sup>14</sup>. Estes fitoquímicos têm atraído muita atenção por serem compostos bioativos com potenciais benefícios para a saúde em numerosas doenças humanas, devido ao seu efeito inibitório enzimático, antimicrobial, antiviral, anticancerígeno, antidiabético, antialérgico e anti-inflamatório; contudo a maior parte dos estudos tem-se concentrado na atividade antioxidante <sup>15</sup>.

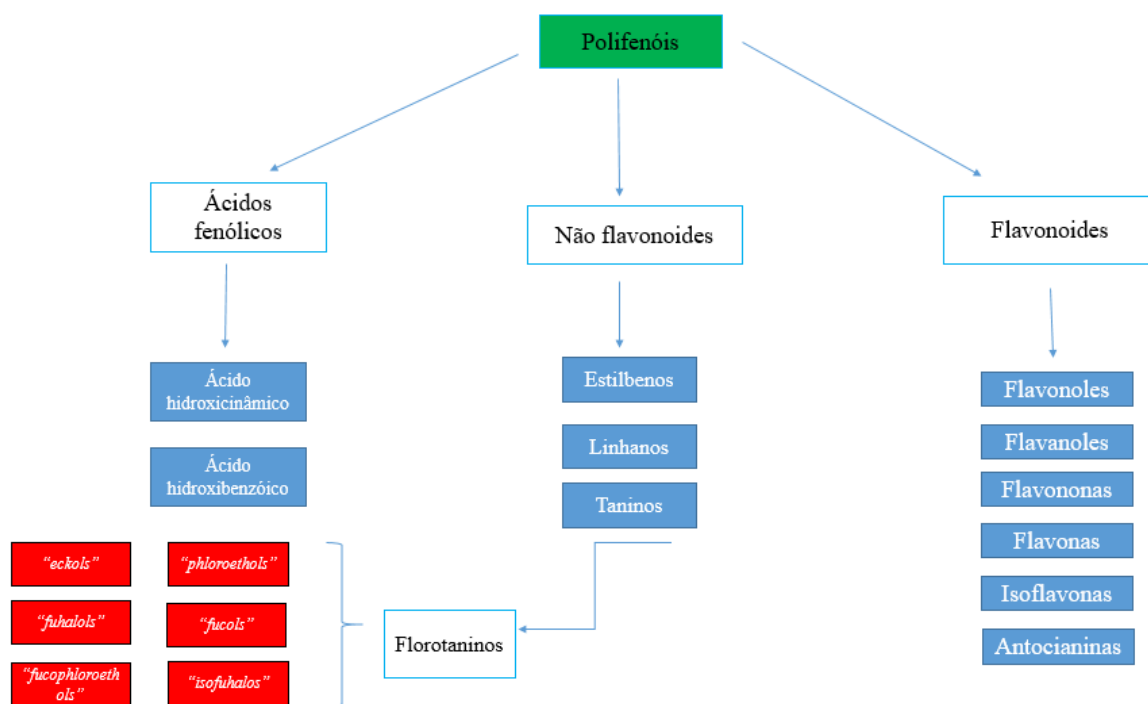
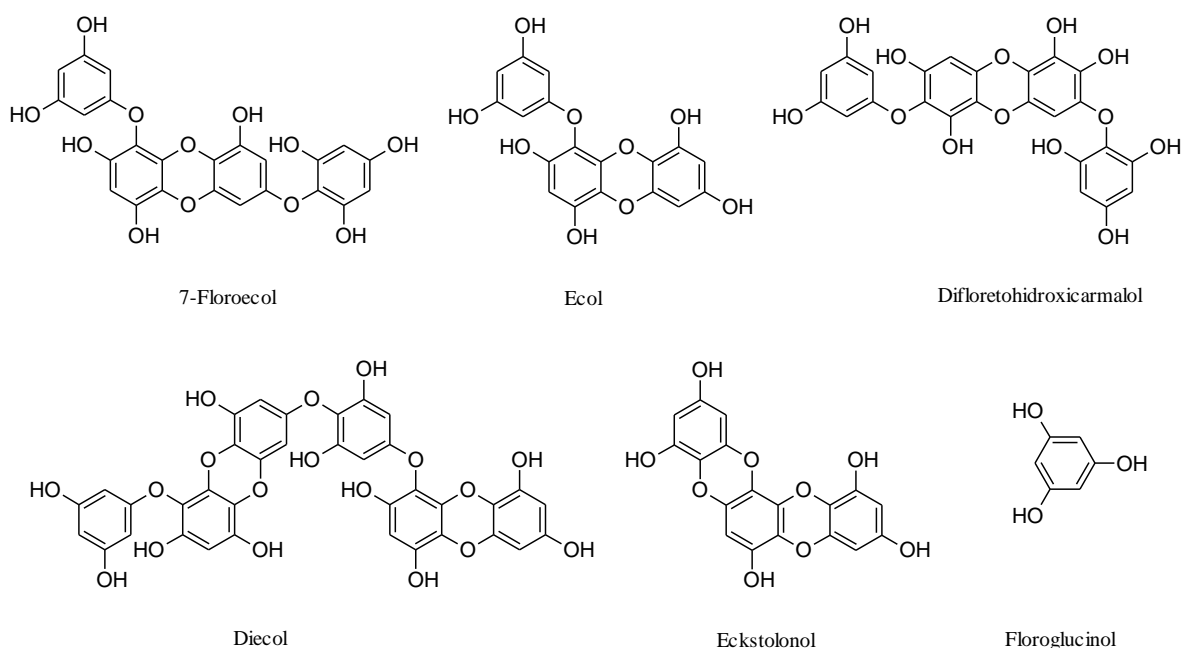


Figura 1.2 - Classificação dos polifenóis e das seis maiores subclasses de taninos na alga, os florotaninos, adaptado de <sup>16</sup>.

### 1.2.2 – Florotaninos

Os florotaninos, metabolito secundário dominante polifenólico encontrado apenas em algas castanhas, têm atraído um considerável interesse no âmbito da investigação devido à sua elevada atividade antioxidante. Os florotaninos são formados pela polimerização de unidades monoméricas de floroglucinol e biossintetizadas pela via do acetato-malonato. Consistem em monómeros de floroglucinol (obtido pela condensação de três unidades de malonil-CoA com descarboxilação e ciclização do 3,5-dicetoheptanodioato) com pesos moleculares que variam entre 126 e 650 kDa. As unidades de floroglucinol podem estar ligadas de várias maneiras originando uma variedade de compostos. Pensa-se que são produzidos pelas algas como modo de lidar com situações de stress e como defesa contra herbívoros <sup>17</sup>. Estes possuem diversas atividades biológicas, tais como antioxidante e prevenção da carcinogénese da pele <sup>18</sup>. Estudos demonstraram que os florotaninos melhoram as desordens de obesidade através de vários mecanismos, por exemplo a inibição da lipase pancreática e a obstrução da diferenciação de adipócitos <sup>19</sup>.

Os florotaninos podem ser classificados em seis subclasses tendo por base o tipo de ligação entre as subunidades de floroglucinol, bem como o número adicional de grupos hidroxilo no esqueleto aromático: floreoacol, ecol, difloretohidroxycarmalol, diecol, eckstolonol, floroglucinol (Figura 1.3).



**Figura 1.3** - Estrutura química dos principais florotaninos, adaptado de <sup>16</sup>.

Em várias algas, como por exemplo *Ecklonia cava*, *Fucus vesiculosus*, *Hizikia fusiformis* e *Sargassum ringgoldianum*, descobriu-se uma atividade antioxidante *in vitro* notoriamente elevada, a qual tem correlação direta com o seu conteúdo total em florotaninos <sup>20</sup>. Propriedades antioxidantes elevadas também foram reportadas em compostos de florotaninos individuais, incluindo ecol, diecol, florofucoacol A e 8,8'-biecol <sup>21</sup>. As atividades captadoras de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e de radicais aniões superóxidos foram duas a dez vezes superior ao alfa-tocoferol e ao ácido ascórbico, dos mais conhecidos e usados compostos antioxidantes. Ensaio anteriores efetuados sobre o potencial antioxidante de dez espécies de algas comuns na Islândia indicaram que *Fucus vesiculosus* tinha o maior conteúdo total em florotaninos, a atividade captadora mais forte do DPPH e dos radicais peróxido e uma moderada capacidade de quelação de iões de ferro <sup>22</sup>.



### 1.2.3 – Fucoxantina

A fucoxantina é um carotenoide marinho presente em algas marinhas castanhas. É encontrada abundantemente em algas comestíveis, como em *U. pinnatifida* <sup>23</sup>. A fucoxantina é um poderoso composto antioxidante com o potencial para aplicação em alimentos funcionais. Este carotenoide também é um dos compostos mais bem estudados das algas devido aos seus efeitos anti obesidade. A sua bioatividade é atribuída ao seu cromóforo polieno, o qual contém uma ligação dupla e dois grupos hidroxilo <sup>24</sup>. A fucoxantina tem uma estrutura única incluindo uma ligação dupla e 5,6-monoepóxido, a qual difere de outros carotenoides comuns como o licopeno e o  $\beta$ -caroteno (Figura 1.4).

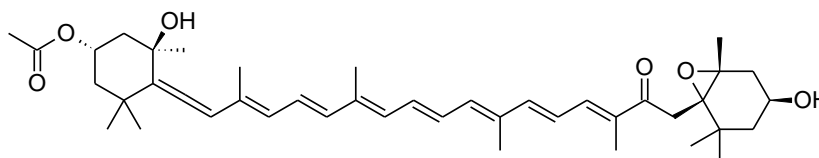


Figura 1.4 - Estrutura química da fucoxantina, adaptado de <sup>25</sup>.

A toma de *U. pinnatifida* rica em fucoxantina demonstrou ter um efeito antidiabético e anti obesidade em modelos de ratos obesos <sup>23</sup>. Usando um modelo de rato demonstrou-se que a fucoxantina diminui a massa do tecido adiposo branco, o nível sérico de triacilgliceróis e aumenta o nível sérico de colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade) <sup>8</sup>. Vários estudos mostraram que a fucoxantina tem um papel importante no combate à obesidade através do seu efeito no metabolismo lipídico. Por exemplo, descobriu-se que a toma de algas marinhas contendo fucoxantina melhora a  $\beta$ -oxidação e reduz a lipogénese <sup>26</sup>. A fucoxantina exerce também o seu efeito no conteúdo lipídico hepático ao regular a atividade de enzimas hepáticas metabólicas e estimulando a oxidação de ácidos gordos <sup>27</sup>. Um estudo demonstrou que, em ratinhos com uma dieta rica em gordura, aqueles que tinham um suplemento de fucoxantina tiveram um menor aumento de peso corporal do que os que não tiveram suplemento. Os resultados são devido à capacidade que a fucoxantina tem de alterar o nível plasmático de adipocinas (citocinas libertadas pelo tecido adiposo), as quais levam ao aumento da  $\beta$ -oxidação e diminuição da expressão de certos enzimas lipogénicos, como sintetase de ácido gordo, enzimas da família da malato-desidrogenase e glucose-6-fosfato desidrogenase, levando à menor acumulação de massa gorda e menor ganho da mesma <sup>25</sup>.

### 1.2.4 – Alginatos

Os potenciais benefícios para a saúde provenientes das algas marinhas devem-se, em certa parte, ao seu elevado conteúdo em fibras dietéticas, as quais não são digeridas em grande extensão no intestino <sup>6</sup>. Tais fibras conseguem aumentar a sensação de saciedade, o que é um fator importante, pois regula a ingestão alimentar e, assim, tem grande significância no controlo da obesidade, para além de que ajudam no trânsito digestivo através da sua capacidade de aumentar o volume fecal. Os alginatos estão entre as fibras de algas marinhas mais conhecidas pelos seus efeitos anti obesidade. Incluem sais e derivados do ácido algínico, um polissacárido gelificante que forma os componentes estruturais das algas marinhas castanhas <sup>28</sup>. São usados amplamente na indústria alimentar como agente espessante ou estabilizador da emulsificação, sendo o alginato de sódio o mais comumente utilizado. Este alginato demonstrou reduzir a permeabilidade do muco intestinal, sugerindo que será capaz de diminuir problemas associados com a elevada absorção de lípidos, tais como a hiperlipidémia <sup>29</sup>. Em adição, a administração de alginato de cálcio mostrou baixar os níveis de colesterol sanguíneos em ratinhos com uma dieta elevada em colesterol <sup>30</sup>.

### 1.3 – Mucilagens

As mucilagens são uma mistura de polissacáridos de elevado peso molecular derivadas de plantas ou fungos, ou produzidos sinteticamente, sendo muito utilizadas nas indústrias alimentar e farmacêutica <sup>31</sup>. A mucilagem é um polissacárido heterogêneo de um 1,4-β-glucano (similar à celulose, mas mais ramificado) e de um material péctico, constituído primariamente por galactose, manose, ramnose e ácido galacturónico. Além de dar uma maior resistência em situações de carência de água, é também responsável por propriedades emulsionantes e de suspensão. A mucilagem tem também a capacidade de formar géis de água, sendo bastante eficaz a aumentar a viscosidade de soluções <sup>32</sup>. São fonte de importantes metabolitos secundários essenciais para a saúde graças a propriedades de redução do apetite, de regulação dos níveis de açúcar no sangue, tensão arterial, colesterol e outros parâmetros de homeostasia. O seu interesse industrial tem vindo a aumentar, devido à sua biodisponibilidade, à sua não toxicidade e aos demais efeitos benéficos para os seus consumidores <sup>33</sup>.

### 1.4 – Atividades biológicas

#### 1.4.1 – Atividade antioxidante

O stress oxidativo é definido como a falta de equilíbrio entre a ocorrência de espécies reativas de oxigénio/nitrogénio (ROS/RNS) e a capacidade do organismo de neutralizar a sua ação através dos sistemas de proteção antioxidativa. Como tal, o stress oxidativo pode ocorrer devido a duas causas principais: um aumento das ROS/RNS ou uma redução da capacidade dos sistemas de proteção antioxidativa <sup>34</sup>.

Os radicais livres são espécies químicas reativas que possuem um eletrão desemparelhado, sendo por isso altamente instáveis e reativos <sup>35</sup>. Estes radicais livres são originados em processos aeróbios, tais como a respiração celular, a exposição a infeções microbianas envolvendo a ativação de fagócitos, durante atividade física intensa ou devido à ação de poluentes ou toxinas, tais como o fumo do tabaco, álcool, radiação UV e pesticidas. Contudo, estas espécies não existem exclusivamente para nos prejudicar, também têm benefícios. Por exemplo, ROS em pequenas quantidades representam moléculas sinalizadoras que estão envolvidas na regulação da proliferação celular, apoptose e expressão génica ao ativar fatores de transcrição. A sua produção pelos fagócitos é também essencial no mecanismo de defesa contra várias espécies de bactérias e fungos <sup>36</sup>. As ROS modulam a função de todas as classes de biomoléculas, conseguindo atingir quase todos os substratos na célula <sup>37</sup>. São capazes de oxidar as cadeias laterais das proteínas, as quais ficam reativas e interagem com outras cadeias de aminoácidos, e de afetar o *folding* e/ou o esqueleto das proteínas, resultando na perda da sua atividade <sup>38</sup>. Estas espécies causam dano aos ácidos nucleicos quebrando as cadeias e alterando as estruturas das bases purina e pirimidina, originando mutações no DNA <sup>39</sup>. No entanto, os mais suscetíveis à oxidação são os lípidos, na medida em que os ácidos gordos polinsaturados, especialmente o ácido araquidónico e o ácido decosahexanóico, são oxidados a malondialdeído e 4-hidroxinonenal, marcadores da existência de oxidação lipídica, sendo que o maior perigo que advém da oxidação lipídica é o dano que causam às membranas celulares <sup>40</sup>.

O dano induzido por radicais livres está envolvido na patogénese e patofisiologia de várias doenças e condições crónicas. No caso do cancro, foi descoberto que as células cancerígenas são caracterizadas por quantidades mais elevadas de ROS do que células saudáveis e que estas são responsáveis por manter o fenótipo cancerígeno <sup>41</sup>. Já no caso da aterosclerose e outras doenças

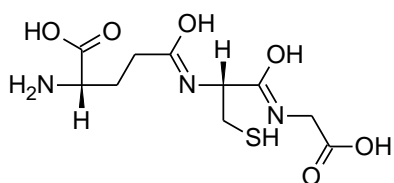
cardiovasculares são responsáveis pelo início do processo de *uptake* de lípidos pelos macrófagos, dado a oxidação das LDL (lipoproteína de baixa densidade) <sup>42</sup>. Têm também impacto nas doenças neurodegenerativas, uma vez que a depleção da membrana fosfolipídica, como resultado da lipoperoxidação, é indicada como uma das maiores causas da doença de Alzheimer (DA) <sup>43</sup>. Encontram-se ainda relacionados com a diabetes, dado que em condições de stress oxidativo, o dano celular poderá afetar a função das células  $\beta$  do pâncreas, produtoras de insulina <sup>44</sup>. Por último, existe uma correlação entre inflamação crónica e stress oxidativo, por exemplo, no caso da asma e da renite alérgica <sup>45</sup>.

O conceito biológico de antioxidante refere-se a qualquer composto que, quando presente a uma concentração inferior comparativamente à de um substrato passível de ser oxidado, é capaz de retardar ou prevenir a oxidação do substrato <sup>46</sup>. Os primeiros tipos de sistema de defesa antioxidante desenvolvidos contra o stress oxidativo são aqueles capazes de prevenir a criação de ROS e os que bloqueiam a formação de radicais livres ou que os capturam. Outro sistema de notar é aquele que repara as moléculas afetadas e as impede de interagir e ter as suas ações nocivas, geralmente efetuado por enzimas <sup>47</sup>.

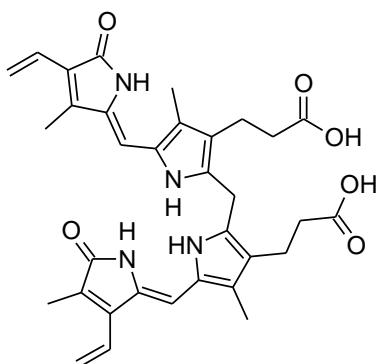
A homeostasia redox da célula é assegurada pelo seu sistema de defesa antioxidante endógeno que inclui enzimas antioxidantes, sendo as principais a superóxido dismutase, catalase e a glutathione peroxidase; moléculas não enzimáticas, tais como a glutathione, proteínas (ferritina, transferrina, ceruloplasmina, albumina); e captadores de baixo peso molecular, como o ácido úrico, co-enzima Q e ácido lipóico <sup>36</sup>. Para esta homeostasia também contribuem antioxidantes exógenos obtidos pela dieta, primariamente pelo consumo de fruta e vegetais, tais como a vitamina C, vitamina E, carotenoides e ácidos fenólicos <sup>48</sup> (Figura 1.5).

As algas têm sido estudadas como uma fonte de antioxidantes. Foi investigada por Athiperumalsami *et al.* (2010) <sup>49</sup> a atividade antioxidante de seis espécies de algas marinhas colhidas no golfo de Mannar e concluíram que as algas marinhas *Acanthophora spicifera*, *Padina tetrastromatica* e *Ulva lactuca* são antioxidantes eficazes, mostrando um menor índice de concentração inibitório que o padrão tocoferol. Também investigaram a atividade antioxidante de um extrato metanólico de *Gracilaria folifera*, a qual mostrou ter maior eficácia que o tocoferol quando testado usando o método de captação do peróxido de hidrogénio. Em 2016, Fernando *et al.* <sup>50</sup> reviram as propriedades antioxidantes de numerosos compostos polifenólicos derivados de algas marinhas e descreveram a sua relação estrutura-atividade. O efeito antioxidante dos polifenóis está relacionado com a sua capacidade de aumentar a atividade de diferentes enzimas (incluindo a catalase, glutathione peroxidase e superóxido dismutase), as suas propriedades de captação de radicais livres e a sua habilidade de interagir com outros alvos moleculares.

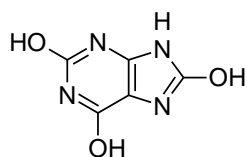
### Antioxidantes Endógenos



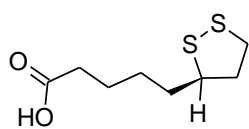
Glutaniona



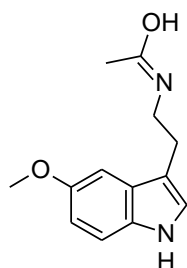
Bilirrubina



Ácido Úrico

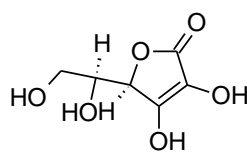


Ácido  $\alpha$ -Lipóico

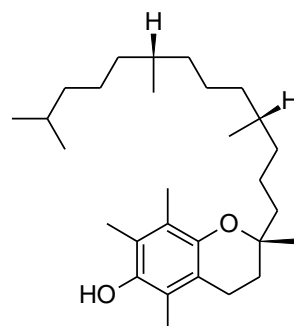


Melatonina

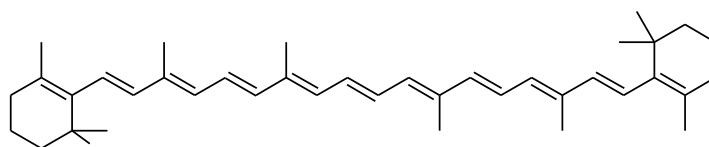
### Antioxidantes Exógenos



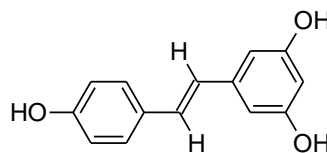
Vitamina C



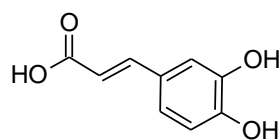
Vitamina E



$\beta$ -Caroteno



Resveratrol



Ácido Cafeico

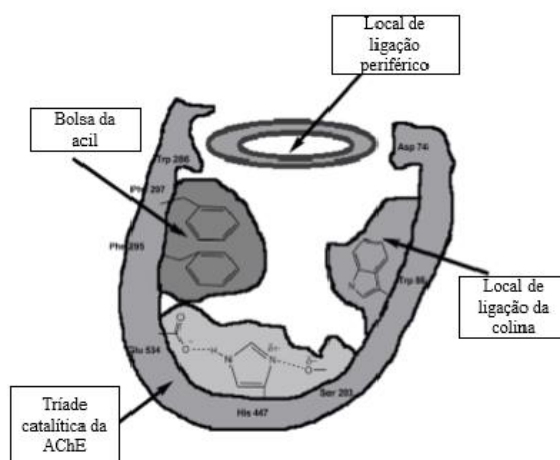
**Figura 1.5** - Representação esquemática da estrutura química dos principais antioxidantes endógenos e exógenos, adaptado de <sup>51</sup>.

### 1.4.2 – Acetilcolinesterase

A acetilcolinesterase (AChE) é responsável por cessar a transmissão do impulso nervoso através da hidrólise rápida do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em numerosas vias colinérgicas no sistema nervoso central e periférico. A inativação do enzima, induzido por vários inibidores, leva à acumulação de ACh, causando hiperestimulação dos recetores nicotínicos e muscarínicos e disrupção da neurotransmissão. Como tal, os inibidores da AChE são vistos como fármacos e toxinas relevantes. No caso dos inibidores reversíveis, estes têm sido muito usados no tratamento de doenças neurodegenerativas, especialmente na DA <sup>52</sup>. A atividade deste enzima é maior nos neurónios motores do que nos sensoriais, existindo em múltiplas formas moleculares, as quais possuem propriedades catalíticas similares, mas diferem na sua organização oligomérica e no modo de ligação à superfície celular <sup>53</sup>.

A AChE, de forma elipsoidal, é uma hidrolase de serina comumente encontrada em junções neuromusculares e sinapses colinérgicas cerebrais. O seu principal papel biológico é a interrupção da transmissão do impulso em sinapses colinérgicas através da hidrólise rápida do neurotransmissor ACh que origina acetato e colina <sup>54</sup>. Este enzima tem uma atividade catalítica com uma especificidade elevada, em particular para uma hidrolase de serina. Cada molécula de AChE degrada cerca de 25000 moléculas de ACh por segundo, aproximando a velocidade de uma reação de difusão controlada <sup>55</sup>.

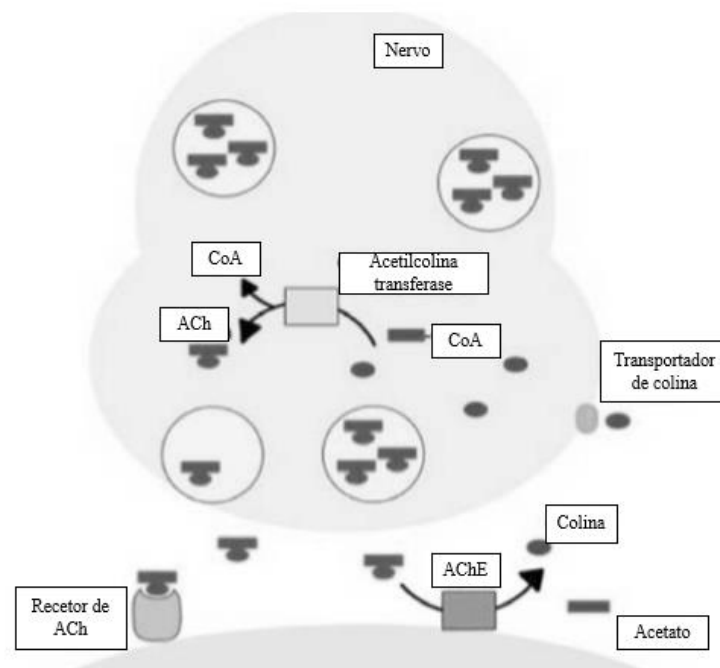
O monómero do enzima é uma proteína  $\alpha/\beta$  contendo doze folhas  $\beta$  mistas rodeadas por catorze hélices  $\alpha$ . A característica mais notável é uma entrada profunda e estreita que penetra até mais de metade do enzima e alarga junto da sua base <sup>56</sup>. O local ativo da AChE está localizado a 4 Å da base da molécula e engloba dois sublocais: o “aniónico” e o “estéreo”, que corresponde à maquinaria catalítica e ao local de ligação da colina, respetivamente <sup>57</sup>. O sublocal aniónico liga-se à amina quaternária positiva da colina da ACh, bem como a ambos os ligandos quaternários, atuando como inibidores competitivos, e a oximos quaternários, os quais efetivamente reativam a AChE inibida por organofosfatos. Os substratos catiónicos não se encontram ligados através de um aminoácido negativamente carregado no local aniónico, mas sim pela interação de catorze resíduos aromáticos que delineiam a entrada que leva ao local ativo <sup>58</sup>. Entre os aminoácidos aromáticos, o triptofano 84 é crítico e a sua substituição pela alanina causa uma diminuição de 3000-fold na atividade enzimática. O sublocal estereo, onde a ACh é hidrolisada a acetato e colina contém, de forma similar aos sublocais catalíticos de outras hidrolases de serina, a tríade catalítica de três aminoácidos: serina 200, histidina 440 e glutamato 327 <sup>59</sup> (Figura 1.6).



**Figura 1.6** - Representação esquemática dos locais de ligação da AChE, adaptado de <sup>52</sup>.

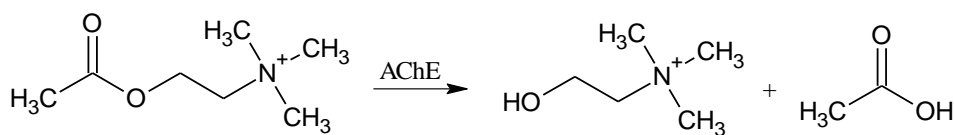
O primeiro neurotransmissor descoberto, ACh, está presente em todos os gânglios autônomos, em vários órgãos inervados autonomamente, na junção neuromuscular e em várias sinapses no sistema nervoso central. No sistema nervoso autônomo, a ACh é o neurotransmissor nos neurônios simpáticos e parassimpáticos pré-ganglionares e na medula adrenal é importante como neurotransmissor em todos os órgãos inervados pelo parassimpático. Também é o neurotransmissor nas glândulas sudoríparas e no músculo piloerector no sistema nervoso simpático autônomo. No sistema nervoso periférico, a ACh atua na junção neuromuscular entre o nervo motor e o músculo-esquelético. No sistema nervoso central, a ACh é encontrada primariamente entre neurônios e algumas vias colinérgicas de axônios longos <sup>60</sup>.

A ACh é sintetizada por uma reação de um único passo catalisada pelo enzima biossintético colina-acetiltransferase (ChAT). A maioria da ACh nas terminações nervosas está contida em vesículas de 100 nm e uma pequena quantidade encontra-se na forma livre no citosol. O *uptake* de ACh em vesículas de armazenamento ocorre através de uma bomba de transporte ativo que acidifica a vesícula. Durante a neurotransmissão, a ACh é libertada do nervo para a fenda sináptica e liga-se a recetores da ACh (nicotínico e muscarínico) na membrana pós-sináptica. A AChE, também localizada na membrana pós-sináptica, termina a transmissão do sinal ao catalisar a hidrólise da ACh. Por fim, a colina libertada da ACh decomposta é captada no nervo pré-sináptico e o neurotransmissor é sintetizado ao combinar com a acetil-CoA, através da ação da ChAT <sup>54</sup> (Figura 1.7).



**Figura 1.7** - Mecanismo de ação da AChE na neurotransmissão, adaptado de <sup>52</sup>.

A reação de hidrólise do éster do carboxilo leva à formação de um enzima acilado e de uma colina livre. Em seguida, o enzima acil sofre um ataque nucleofílico de uma molécula de água, assistida pelo grupo histidina 440, libertando ácido acético e regenerando o enzima livre <sup>61</sup> (Figura 1.8).



**Figura 1.8** - Reação de hidrólise do éster da acetilcolina catalisada pelo enzima acetilcolinesterase, dando origem a colina e ácido acético <sup>52</sup>.

Em adição aos dois sublocais do centro ativo do enzima, a AChE contém um ou mais locais aniônicos periféricos distintos da bolsa de ligação da colina do centro ativo. Estes servem para a ligação da ACh e outros ligandos quaternários, atuando como inibidores não competitivos que se ligam a um local claramente distinto daqueles ocupados por inibidores competitivos monoquaternários. Este local está envolvido nas características inibitórias do substrato da AChE <sup>59</sup>.

O conhecimento da estrutura da AChE é essencial para o entendimento da sua elevada eficácia catalítica e a base molecular para o reconhecimento da ACh e outras proteínas que fazem a ligação da ACh (entenda-se recetores ACh), bem como a elucidação do mecanismo de ação subjacente da ação farmacológica e toxicológica destes agentes com a finalidade da criação de fármacos <sup>62</sup>.

Os inibidores da AChE impedem a hidrólise da ACh, o que causa um aumento do nível e duração da ação do neurotransmissor. De acordo com o mecanismo de ação, os inibidores da AChE podem ser divididos em irreversíveis, os quais estão associados a efeitos tóxicos, e reversíveis, que desempenham um papel importante na manipulação farmacológica da atividade enzimática <sup>52</sup>.

### 1.4.3 – HMG-CoA Redutase

O colesterol é um produto da via do mevalonato e o precursor de todos os esteróis e isoprenóides no organismo, os quais precedem biossinteticamente da redução enzimática da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) <sup>63</sup>. Apesar da sua má reputação, o colesterol é necessário nos mamíferos e é crucial para a função celular normal, uma vez que é o maior componente estrutural das membranas celulares, o precursor da via de síntese dos ácidos biliares e participa na reparação de danos tecidulares. Em adição, atua como substrato para a síntese de hormonas esteroides, como precursor para a vitamina D e é um fator integral para a morfogénese embriogénica, transdução de sinais e desenvolvimento do esperma. No entanto, o aumento do colesterol acima dos valores saudáveis é tóxico e desempenha um papel central nas doenças cardiovasculares. Salienta-se que o colesterol não é um requerimento essencial na dieta, pois o ser humano é capaz de o produzir <sup>64</sup>. A sua biossíntese é maioritariamente regulada no fígado pelo enzima HMG-CoA Redutase (HMGR) <sup>65</sup>. Tem-se demonstrado que a inibição deste enzima é dos métodos mais eficazes na redução de LDL, o que resulta na eventual redução da incidência das doenças cardiovasculares <sup>66</sup>. O que ocorre é que a inibição da HMGR conduz ao aumento da produção de recetores LDL ao ativar a SREBP (“*sterol response element-binding protein*”), um fator de transcrição que promove a expressão do gene recetor da LDL, o qual reduz os níveis de LDL na circulação sistémica <sup>67</sup>.

## 1.5 – Colesterol

### 1.5.1 – Descrição, noções básicas e funções biológicas

O colesterol é uma molécula orgânica biossintetizada e um componente estrutural essencial da membrana celular de todas as células animais, não existindo em células vegetais. Em adição, este esterol também serve como precursor para a biossíntese de hormonas esteroides, ácido biliar e vitamina D. Dado que o colesterol é um lípido, não pode entrar na corrente sanguínea por si só, uma vez que não surtiria nenhum efeito para além de causar coágulos, caso haja acumulação do mesmo. Assim sendo, o corpo armazena o colesterol e outros lípidos em partículas cobertas de proteínas, denominadas lipoproteínas. O colesterol e outros lípidos circulam na corrente sanguínea em várias formas. Em primeiro lugar, temos as quilomicras, partículas que contêm triglicéridos (ácidos gordos da dieta) e são originadas no sistema digestivo e, por essa razão, são influenciadas pelo que comemos. Em seguida, temos as VLDL (lipoproteínas de muito baixa densidade) que também levam triglicéridos aos tecidos, contudo são originadas no fígado. À medida que o corpo extrai ácidos gordos das VLDL as partículas tornam-se IDL (lipoproteínas de densidade intermédia) e com uma maior extração tornam-se LDL. As partículas IDL são removidas rapidamente pelo fígado e algumas tornam-se em LDL, que são ainda mais ricas em colesterol puro, visto que os triglicéridos que continham já foram extraídos. Estas são conhecidas como o colesterol “mau”, pois levam o colesterol aos tecidos e o seu aumento está relacionado diretamente com a incidência de doenças cardiovasculares, como a aterosclerose. Por último, temos as HDL, que são chamadas de colesterol “bom”, uma vez que removem o colesterol da circulação e o retornam ao fígado para ser excretado <sup>68</sup>.

O colesterol e os seus metabolitos, como os sais biliares, hormonas esteroides e oxisteróis realizam importantes funções biológicas, servindo como um componente vital para a estrutura e função da membrana celular dos vertebrados. O colesterol no corpo é produzido no fígado e tecidos periféricos e é absorvido do intestino, vindo de fontes da dieta ou de sais biliares <sup>69</sup>. O fígado é o maior órgão para a síntese e secreção do colesterol endógeno e secreta cerca de 1 g de colesterol diariamente. O intestino absorve aproximadamente 50 % do colesterol o que representa mais ou menos 400 mg do colesterol da dieta diário, sendo o restante excretado nas fezes <sup>70</sup>.

A homeostase do colesterol no corpo é mantida pela síntese “*de novo*”. O fígado, que facilita a eliminação de partículas VLDL e de quilomicras remanescentes contendo colesterol, tem sido considerado como o maior local de controlo na manutenção da homeostase do colesterol. A biossíntese do colesterol envolve uma variedade de reações enzimáticas que estão bem definidas e reguladas por *feedback* <sup>71</sup>. Em anos recentes, a importância do intestino, o qual tem um grande impacto na homeostase do colesterol ao nível da absorção do colesterol, excreção fecal e síntese “*de novo*”, tem sido cada vez mais reconhecida em vários aspetos da fisiologia do colesterol <sup>72</sup>. Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1), o qual é um alvo do inibidor do *uptake* do colesterol da dieta, ezetimibe, medeia a absorção do colesterol intestinal e a reabsorção do colesterol biliar <sup>73</sup>. Por outro lado, o heterodímero dos transportadores G5 e G8 da ATP-binding cassette (ABC) (ABCG5/G8) medeia o efluxo de colesterol e esteróis de plantas nos enterócitos da dieta de volta para o lúmen. A expressão destes genes é regulada por recetores do peroxissoma ativador da proliferação (PPARs) e o recetores X do núcleo do fígado (LXRs) <sup>74</sup>.



### **1.5.2 – Doenças relacionadas com o colesterol**

As doenças cardiovasculares constituem a principal causa de morte no mundo, sendo responsáveis por um terço das mortes globais. Estas estão associadas a diferentes problemas com os vasos sanguíneos e o coração, incluindo doença coronária, hipertensão, trombose, doença cerebrovascular, entre outras. Foram identificados vários fatores de risco para estas doenças sendo de grande importância o colesterol elevado, a obesidade, a dislipidemia, o fumo do tabaco e o historial familiar <sup>75</sup>. A obesidade é uma desordem metabólica caracterizada pelo excesso de acumulação de massa gorda, com índice de massa corporal (IMC) superior a 30 kg/m<sup>2</sup>, refletindo-se num aumento da circunferência da cintura. A doença deve-se maioritariamente ao excesso de ingestão alimentar, à falta de atividade física e a fatores genéticos. Com base num estudo recente efetuado, analisando o IMC de populações de mais de 200 países, estima-se que em 2025 a obesidade global será maior do que 6 % nos homens e 9 % nas mulheres <sup>76</sup>. A obesidade tem-se revelado ser uma ameaça global à saúde pública, debilitando a qualidade de vida e impondo um aumento do gasto em cuidados de saúde. Nos indivíduos obesos, revela-se um aumento do risco de desenvolver diabetes tipo 2, dislipidemia, hipertensão, doença cardiovascular e certos tipos de cancro. O nível de colesterol plasmático depende de vários fatores da dieta e genéticos e é influenciado pela absorção do colesterol intestinal e da síntese hepática do colesterol. A regulação precisa da homeostase do colesterol é essencial e é bem reconhecido que a hipercolesterolemia promove a aterosclerose e, por essa mesma razão, representa um grande fator de risco para a doença cardiovascular <sup>77</sup>. Além disto, anormalidades no metabolismo do colesterol têm sido associadas com a diabetes tipo 2. Em vários estudos transversais, a resistência à insulina e a obesidade têm sido associadas ao aumento da síntese de colesterol e à reduzida absorção de colesterol <sup>78</sup>. A dislipidemia diabética é tipicamente caracterizada pelo aumento de VLDL e pela redução de HDL, mas surpreendentemente não se registou alterações nos níveis de colesterol LDL <sup>79</sup>. Um aumento da absorção intestinal de colesterol é característico de certas doenças, como a diabetes Mellitus, levando a um elevado nível de colesterol plasmático e a um aumento do risco de doenças cardiovasculares <sup>80</sup>.



## **2 – OBJETIVOS**



As algas foram recentemente introduzidas na alimentação portuguesa por influência da cozinha japonesa. Surgiram assim no mercado produtos à base de algas, principalmente como suplementos alimentares pelas potenciais características nutricionais e funcionais do seu consumo. A alga *Undaria pinnatifida*, conhecida vulgarmente como wakame, é uma alga castanha que é já há algum tempo consumida no mundo asiático. Esta não existia na costa portuguesa, contudo recentemente tem sido encontrada, sobretudo no estuário da ria de Aveiro. Tem-se descoberto cada vez mais propriedades benéficas para o ser humano, tais como a capacidade antioxidante e o efeito sobre o colesterol da dieta.

Neste trabalho propõe-se determinar as atividades biológicas de vários extratos da alga com o intuito de saber o seu potencial benefício para a saúde, com a possível extração de compostos bioativos que tenham impacto positivo no nosso organismo, quer seja na prevenção ou no tratamento de alguma doença. Para dar cumprimento a estes objetivos procedeu-se então:

- À aplicação de métodos de purificação pela precipitação de mucilagens;
- À análise dos processos biológicos que a alga se sujeita no nosso organismo, tais como a digestão gástrica e pancreática;
- À determinação da atividade antioxidante, recorrendo ao doseamento de fenóis totais e ao ensaio de captura do radical DPPH;
- À pesquisa da atividade inibitória enzimática, nomeadamente da acetilcolinesterase e da HMG-CoA Redutase;
- À análise dos diferentes extratos por HPLC-DAD e identificação de compostos recorrendo à espectrometria de massa;
- À determinação da citotoxicidade dos extratos em células Caco-2 e Hep-G2;
- Ao estudo da ação dos extratos sobre o proteoma celular de Caco-2 e Hep-G2.



### **3 – PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL**





### 3.1 – Reagentes

Durante a análise dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fotodíodos (HPLC-DAD) foi utilizado acetonitrilo (ACN) da Carlo Erba, ácido trifluoracético (TFA) da Merck e água Millipore (resistividade 18,2 MΩ cm, a 25 °C), que foi retirada de um sistema de purificação de água *Milli-Q Academic* da Merck.

Na análise por espectrometria de massa (MS), os eluentes utilizados foram ACN, ácido fórmico e água da Fisher Scientific, Optima™.

Na precipitação das mucilagens utilizou-se o etanol 96 % da Carlo Erba e na quantificação dos fenóis totais adquiriu-se o ácido gálico e o reagente de Folin-Ciocalteu à Sigma e o carbonato de sódio à Merck.

Para a digestão gástrica utilizou-se cloreto de sódio da Merck, ácido clorídrico da Fisher Chemical e pepsina da Fluka. Para a digestão pancreática usou-se dihidrogenofosfato de potássio e hidrogenofosfato de potássio da Merck e pancreatina da Sigma.

No ensaio de atividade antioxidante utilizou-se quercetina e 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) da Sigma e metanol da Riedel-de Haën™.

Nos ensaios da determinação da atividade enzimática recorreu-se à acetilcolinesterase (AChE), ao iodeto de acetilcolina (AChI), ao 5-5'-ditiobis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB), à galantamina e ao “*kit*” do ensaio da HMG-CoA Redutase da Sigma, ao tris (hidroximetil-aminometano) (Tris) e ao cloreto de sódio da Merck e ao cloreto de magnésio hexahidratado da Pancreac.

Para os ensaios com as linhas celulares, o meio RPMI, o soro bovino fetal (FBS), o pen-strep (penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 U/mL), a tripsina (10x) e a L-glutamina (2 Mm) da Lonza, o azul de tripano e o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-1-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) são da Sigma e o metanol da Riedel-de Haën™. Para fazer a “*Hank’s Balanced Salt Solution*” (HBSS) utilizou-se D-glucose da Himedia Laboratories Limited; cloreto de cálcio, hidrogenocarbonato de sódio e dihidrogenofosfato de potássio da Merck; cloreto de potássio da Fluka; sulfato de magnésio da Sigma; hidrogenofosfato de sódio, cloreto de cálcio e cloreto de magnésio hexahidratado da Pancreac.

Nas eletroforeses utilizou-se Tris, 3-[(3-Colamidopropil)dimetilamónio]-1-propano sulfato (CHAPS) e ácido acético glacial da Merck, metanol da Riedel-de Haën™, persulfato de amónio (PSA), glicina, iodoacetamida e dodecil sulfato de sódio (SDS) da Sigma, glicerol e agarose da Promega, marcador de proteínas NZYBlue e tetrametiletilenodiamina (TEMED) da NZYTech, ditioneitol (DTT), tampão de gradiente de pH imobilizado pH 3-11 NL (IPG), ureia e tiourea da GE Healthcare Life Sciences, azul de bromofenol da Pancreac, azul brilhante de Coomassie R-250 da Bio-Rad e Acrilamida/bis (29:1) da Amresco.

### 3.2 – Equipamento

Ao longo de todo o trabalho experimental as pesagens foram efetuadas numa balança Sartorius® BP 110S e para massas superiores usou-se a balança Sartorius® BP 1200. Usou-se também um vórtex Heidolph® REAX 2000, um ultra-sons Elma® Transsonic 460/H e uma placa de aquecimento com agitação Agimatic-N JP Select®. Para as medições do pH utilizou-se um medidor edge® para pH/ORP da Hanna Instruments e para incubação das amostras utilizou-se um banho da GFL® 1083. As amostras foram concentradas num evaporador rotativo Buchi® Rotavapor R-200, acoplado a um sistema de vácuo Buchi B-169 e a um banho Buchi B-490 e foram secas num liofilizador Heto® PowerDry LL 3000, acoplado a uma bomba Edwards RV3.

Na precipitação das mucilagens utilizou-se uma centrífuga Beckman® J2-21 M/E, com um rotor JA-20.1 e para amostras de menor volume usou-se uma centrífuga Minispin® 5415D da Eppendorf® a qual também foi utilizada nas eletroforeses.

Para a microscopia eletrônica de varrimento utilizou-se um microscópio eletrônico de varrimento JEOL 5200LV (JEOL Ltd, Tokyo, Japan).

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados num leitor de microplacas TECAN® Sunrise e os ensaios da redução do radical livre DPPH, da quantificação de fenóis totais, bem como da inibição da AChE e da HMG-CoA Redutase foram realizados num espectrofotómetro Shimadzu® UV-160A.

Para os ensaios com as linhas celulares, as condições de esterilidade necessárias foram garantidas usando uma câmara de fluxo laminar Esco® *Class II Biohazard Safety* e as células foram incubadas numa estufa *Shel Lab CO<sub>2</sub> Series* do Sheldon Mfg.Inc®. A visualização e contagem das células foi realizada num microscópio ótico MOTIC® AE21. Para medir a resistência das células utilizou-se o aparelho de medição Millicell ERS-2 V-Ohm da Millipore.

Para a análise proteica das células Hep-G2 recorreu-se ao sistema “Mini-Protein 3 cell” da Bio-Rad e os géis obtidos foram fotografados no processador de imagem ImageQuant LAS 500 da GE Healthcare Life Sciences®. Para a eletroforese bidimensional, além da centrífuga e do sistema “Mini-Protein 3 cell” previamente mencionados, utilizou-se também o sarcófago 7 cm Immobiline DryStrip pH 3-11 NL e Ettan™ IPGphor™ II da Amersham Biosciences.

### **3.3 – Preparação da alga *U. pinnatifida* para extrações: processo de obtenção do pó da alga**

A alga *U. pinnatifida*, apanhada no estuário da ria de Aveiro, foi lavada com água para retirar o muco presente no exterior. De seguida, retirou-se o pé da mesma, que foi descartado, assim como o caule, sendo que o restante material foi cortado em pequenos pedaços e armazenado em recipientes para serem secos no liofilizador. Após a secagem procedeu-se à trituração do material até à obtenção do pó. Ao longo de todo o trabalho o pó liofilizado foi mantido a - 20 °C.

#### **3.3.1 – Extração a 100 °C durante 30 minutos de *U. pinnatifida* (W100)**

Segundo o método descrito por Wang *et al*<sup>22</sup>, foi preparada uma decocção usando 5 g de alga em pó em 100 mL de água destilada, contando o tempo de 30 minutos aquando do início da ebulição. Retirou-se apenas o líquido resultante desta decocção e centrifugou-se a 5000 g, durante 15 minutos, a 4 °C. Após centrifugação, descartou-se o precipitado e o sobrenadante foi seco no liofilizador. Ao longo de todo o trabalho o extrato foi mantido a - 20 °C.

#### **3.3.2 – Extração de 24 h sob agitação de *U. pinnatifida* (W24)**

Mais uma vez, segundo o método descrito por Wang *et al*<sup>22</sup>, utilizou-se 5 g de alga em pó em 100 mL de água destilada, na qual se colocou uma barra magnética no interior e foi colocada sobre um agitador de plataforma a 200 g, durante 24 horas, à temperatura ambiente. Novamente, decantou-se esta solução, que foi centrifugada a 5000 g, durante 15 minutos, a 4 °C. Após centrifugação, o precipitado foi descartado e o sobrenadante seco no liofilizador. Ao longo de todo este trabalho o extrato foi mantido a - 20 °C.

### 3.3.3 – Precipitação das mucilagens

A precipitação das mucilagens foi realizada nos dois extratos de *U. pinatifida* obtidos previamente, segundo a metodologia descrita por Henriques *et al*<sup>81</sup>, com ligeiras modificações. Para isso, dissolveu-se 200 mg de cada extrato em 20 mL de água destilada. Em seguida, foram adicionados 80 mL de etanol a 96 % e a solução foi colocada no gelo durante 2 horas, sendo depois centrifugada a 4500 g, durante 30 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e guardado e ao precipitado foi adicionado novamente 80 mL de etanol a 96 %, a solução foi colocada no gelo durante mais 2 horas e, em seguida, centrifugada a 4500 g, durante 30 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido e adicionado ao prévio, concentrado no evaporador rotativo e seco no liofilizador, tendo sido guardado durante todo o trabalho à temperatura de - 20 °C.

## 3.4 – Condições analíticas do HPLC-DAD

As análises dos extratos por HPLC foram realizadas num VWR-Hitachi Elite LaChrom®, equipado com uma coluna LiChroCART® RP18, 100 Å, 250x4 mm, 5 µm (Merck), um injetor automático L-2200, um forno de coluna L-2300 a 30 °C e um detetor de fotodíodos (DAD) L-2455. O *software* utilizado na aquisição dos dados foi o EZChrom Elite®.

### 3.4.1 – Análise qualitativa do extrato aquoso de *U. pinnatifida*

Na análise das amostras por HPLC utilizou-se uma fase móvel constituída por um sistema binário composto por ACN (A) e por 0,05 % v/v de TFA em água (B), tal como se pode observar na tabela 3.1. Durante as corridas, os eluentes foram usados de forma que o gradiente permitisse a separação dos compostos de *U. pinnatifida*. Para cada corrida foram injetados 25 µL da amostra à concentração de 1 mg/mL e a deteção foi realizada entre os 200 e os 500 nm, durante 30 minutos.

**Tabela 3.1** – Gradiente utilizado na análise das amostras por HPLC-DAD.

Tempo (minutos)	% A	% B	Fluxo (mL/min)
0	0	100	0,8
30	30	70	0,8
40	80	20	0,8
45	80	20	0,8
50	30	70	0,8

## 3.5 – Condições analíticas do LC-MS

A análise dos extratos de *U. pinnatifida* foi realizada por cromatografia líquida de alta resolução e espetrometria de massa *tandem* de alta resolução (LC-HRMS/MS), num sistema Elute OLE UHPLC acoplado a um espetrómetro de massa quadrupolo-tempo de voo (QTOF) Impact II e equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI) (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemanha). Para os diferentes extratos injetou-se 5 µL de uma solução de 5 mg/mL do extrato W100 e 5 µL de uma solução de 1 mg/mL do extrato WDig.

A separação cromatográfica foi realizada numa coluna Intensity Solo 2 C18, 100 x 2,1 mm, 1,8 µm (Bruker Daltonik GmbH) e o injetor automático e a coluna foram mantidos a 10 °C e 35 °C, respetivamente. Neste ensaio, utilizou-se uma fase móvel composta por 0,1 % v/v de ácido fórmico em

água (A) e 0,1 % v/v de ácido fórmico em ACN (B), com um fluxo de 250 µL/min. As condições de eluição foram as seguintes: 0 min, 95 % A, 5 % B; 1,5 min, 95 % A, 5 % B; 13 min, 25 % A, 75 % B; 18 min, 0 % A, 100 % B, 21 min, 0 % A, 100 % B, 23 min, 95 % A, 5 % B e 30 min 95 % A, 5 % B.

Os espectros de massa de alta resolução foram adquiridos nos modos ESI positivo e negativo, num intervalo entre  $m/z$  50-1500 e no modo de aquisição dependente de dados (auto MS/MS) com um varrimento de 3 Hz. Os parâmetros experimentais utilizados foram os seguintes: voltagem do capilar: + 4,0 e - 3,5 kV; “offset”: 500 V, gás nebulizador (N<sub>2</sub>): 29 psi; gás de secagem (N<sub>2</sub>): + 8,0 e - 4,0 L/min; temperatura do gás de secagem: 200 °C.

A calibração interna foi realizada no modo de alta precisão (HPC), utilizando-se uma solução de formato de sódio 10 mM, introduzida na fonte de íons no início de cada aquisição, através de um *loop* de 20 µL, usando uma válvula de seis portas.

Os dados foram adquiridos e processados recorrendo ao *software* DataAnalysis 4.4 (Bruker Daltonik GmbH).

### 3.6 – Digestões de *U. pinnatifida*

Com o intuito de estudar as transformações a que a alga está sujeita após a sua ingestão, simulou-se a digestão *in vitro* com suco gástrico, de forma a descobrir se outros compostos eram extraídos da *U. pinnatifida* e, sobretudo, se o processo de digestão em si não causaria uma diminuição da atividade ou quantidade dos compostos da alga. Para ser possível entender melhor os potenciais benefícios dos polifenóis (dos alimentos da nossa dieta) na saúde humana e em particular na saúde do intestino, é essencial determinar o seu destino metabólico. Como parte da dieta, os polifenóis são ingeridos como uma mistura complexa imersa numa matriz alimentar, a qual sofre um processo de digestão no intestino. É de relevância determinar como este processo de digestão afeta os polifenóis e a sua estabilidade, dado que tal irá afetar a sua biodisponibilidade, bem como os seus potenciais efeitos benéficos<sup>82</sup>.

É importante saber que o processo de digestão não ocorre exclusivamente com o suco gástrico, sendo que outros, como por exemplo o suco pancreático, têm a sua relevância e digerem outros macronutrientes que não são digeridos inicialmente no estômago e podem inclusive alterar a composição ou quantidade do composto da nossa amostra. Um estudo realizado por Cilla *et al.*<sup>83</sup> demonstrou que quando sujeitamos polifenóis, provenientes de bebidas de frutas, a condições ácidas do estômago seguido por um meio pancreático, regista-se uma diminuição do seu conteúdo. Por esta razão, para além da digestão com suco gástrico foi também efetuada com suco pancreático.

#### 3.6.1 – Digestão com suco gástrico

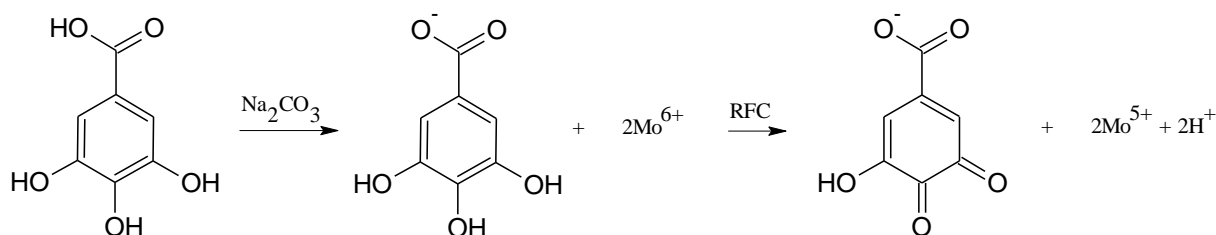
Seguindo a metodologia indicada em Porfírio *et al.*<sup>84</sup>, a solução de suco gástrico foi preparada com 16 mg de pepsina, 10 mg de NaCl e 5 mL de água a pH 1,2 (idêntico ao do estômago). À solução de 2,5 mL de alga com água destilada (10 mg/mL), adicionou-se 2,5 mL da solução do suco gástrico, agitados vigorosamente, e retirou-se imediatamente 100 µL dessa mistura para um *eppendorf*, o qual já possuía 900 µL de metanol, de forma a parar a reação (amostra a tempo 0 (zero)). Em seguida, a mistura foi colocada a incubar num banho a 37 °C durante 4 horas. Foi retirada uma amostra e efetuado o mesmo procedimento ao tempo de 4 horas e ao fim de 24 horas. Foi também realizado um branco ao qual se adicionou o mesmo volume de apenas suco gástrico em vez da mistura. As amostras foram então analisadas por HPLC.

### 3.6.2 – Digestão com suco pancreático (WDig)

Segundo o método descrito por Porfírio *et al*<sup>84</sup>, o suco pancreático consiste em 250 mg de pancreatina dissolvidas em 10 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM, pH = 8. A 2,5 mL desta solução adicionou-se o mesmo volume de uma solução da amostra em estudo a 10 mg/mL, que foi incubada a 37 °C. Retiraram-se alíquotas de 100 µL aos tempos 0 horas, 4 horas e 24 horas, que foram adicionados aos 900 µL de metanol para posterior análise no HPLC. Simultaneamente foi também retirado 1 mL para se efetuar os ensaios de quantificação de fenóis totais, capacidade de redução do radical DPPH e de inibição dos enzimas AChE e HMGR. Ambas as amostras antes de serem analisadas foram centrifugadas a 5000 g durante 5 minutos e o sobrenadante recolhido foi utilizado para os diferentes ensaios.

### 3.7 – Quantificação dos fenóis totais

Para o doseamento dos fenóis totais, a metodologia adotada tem por base a reação de oxidação-redução dos grupos hidroxilo dos fenóis com o reagente de Folin-Ciocalteu (RFC), em meio alcalino ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Nesta reação, o complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico presente no RFC, em que o molibdénio se encontra no estado de oxidação VI, é reduzido a uma mistura de óxidos de molibdénio e de tungsténio por eletrões provenientes dos compostos fenólicos de cor azul (Figura 3.1)<sup>85,86</sup>. A intensidade da coloração é proporcional ao teor de compostos fenólicos presentes na amostra e é avaliada no espectrofotómetro a 760 nm.



**Figura 3.1** – Reação do ácido gálico com o molibdénio (componente do reagente de Folin-Ciocalteu), adaptado de <sup>82</sup>.

O ensaio foi feito sempre com três replicados, adotando o método descrito por Lee *et al*<sup>87</sup>, com pequenas modificações. Antes de proceder à realização do ensaio com a amostra, é necessário traçar uma reta de calibração, usando como padrão o ácido gálico. Para tal, adicionou-se num *ependorf* os seguintes reagentes: 1350 µL de água *Milli-Q*, 30 µL da solução padrão a várias concentrações (10-500 µL/mL), 30 µL de RFC e agitou-se no vórtex durante uns segundos. Aguardou-se minutos antes de se adicionar 90 µL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 2 % e agitou-se durante 2 horas numa sala refrigerada a 4 °C.

Posteriormente, as absorvências foram medidas a 760 nm e traçou-se uma reta de calibração da absorvência em função da concentração do ácido gálico (Anexo 1), obtendo-se a seguinte equação:

$$\text{Abs} = 0,0382 \text{ c} - 0,0003 \quad [\text{Eq. 3.1}]$$

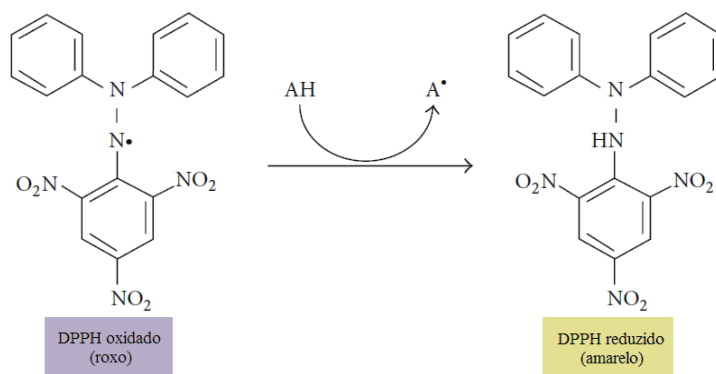
**Abs** diz respeito à absorvência a 760 nm e **c** à concentração de equivalentes de ácido gálico (GAE µg/mL).

Em seguida, passou-se à quantificação dos fenóis totais nas amostras em estudo. Como tal, procedeu-se de igual modo ao descrito anteriormente com a única diferença de se adicionar 30 µL das diferentes amostras (10 mg/mL), em vez de se adicionar o mesmo volume da solução padrão. Para obtermos o valor da quantidade de fenóis substituímos o valor da absorvência obtido na equação da

reta de calibração com o ácido gálico. Por último, é importante notar que os resultados obtidos são apresentados em µg de fenóis/mg de extrato, sendo estes expressos em equivalentes de ácido gálico.

### 3.8 – Determinação da atividade antioxidante da *U. pinnatifida*

O ensaio do 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) é um dos mais utilizados para avaliar a capacidade antioxidante de extratos de plantas e algas. Este método baseia-se na transferência de eletrões ou de radicais de hidrogénio de um composto antioxidante para o radical livre DPPH, resultando numa molécula diamagnética estável <sup>86</sup>. Esta reação leva a que o DPPH<sup>•</sup> seja reduzido a hidrazina, alterando a cor da solução, passando de uma coloração roxa a uma amarela (Figura 3.2). Tendo em conta que se trata de um método colorimétrico, esta mudança de cor pode ser seguida no espectrofotómetro a 517 nm, uma vez que este é o comprimento de onda a que o DPPH oxidado absorve <sup>86,88</sup>. Deste modo, quanto menor for a absorvência a este comprimento de onda, maior vai ser a capacidade antioxidante da amostra em estudo, pois tal indica uma menor quantidade de DPPH oxidado.



**Figura 3.2** – Princípio do teste da capacidade de redução do radical livre DPPH na presença de uma amostra com propriedades antioxidantes, adaptado de <sup>85</sup>.

A atividade antioxidante do extrato de *U. pinnatifida* foi avaliada, em triplicado, utilizando o método descrito por Falé *et al* <sup>89</sup>. Antes de realizar o ensaio é necessário fazer a solução de DPPH a 0,002 % em metanol, cuja absorvência tem de ser aproximadamente 0,700, caso contrário, tem que ser ajustada. Para o ensaio adicionou-se à *cuvette* de trás 1000 µL de metanol + 10 µL da solução extrato para uma concentração final de 1 mg/mL e à *cuvette* da frente 1000 µL da solução de DPPH + 10 µL da solução extrato, também com a mesma concentração previamente mencionada. Foi também realizado um controlo, no qual se adicionou 10 µL de água, em vez do mesmo volume da solução extrato. As soluções foram incubadas durante 30 minutos, à temperatura ambiente, e depois leram-se as absorvências a 517 nm.

A percentagem de atividade antioxidante de cada amostra foi calculada através da seguinte expressão:

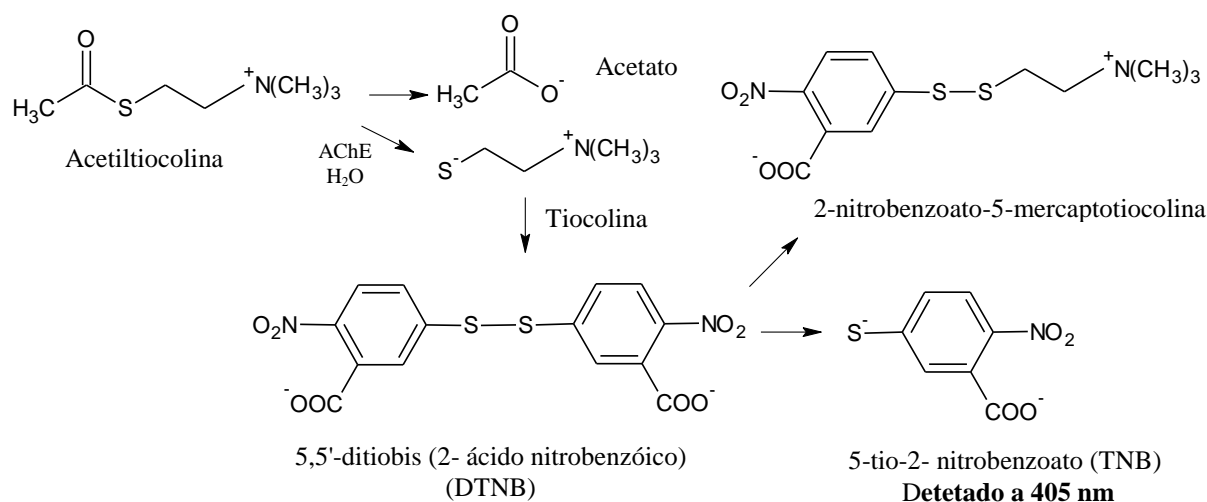
$$AA (\%) = 100 \times ((A_{DPPH} - A_{amostra})/A_{DPPH}) \quad [Eq. 3.2]$$

Em que **AA (%)** refere-se à percentagem de atividade antioxidante, **A<sub>DPPH</sub>** à absorvência da solução controlo e **A<sub>amostra</sub>** à absorvência das amostras.

### 3.9 – Determinação da atividade enzimática da *U. pinnatifida*

#### 3.9.1 – Inibição da acetilcolinesterase (EC 3.1.1.7)

A acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor fundamental nas junções neuromusculares, sendo a acetilcolinesterase (AChE) o enzima responsável pela hidrólise da ACh em colina e acetato, cessando assim a sua atividade. A inibição da AChE leva a uma menor destruição da ACh, que atuará um maior período de tempo, havendo uma maior motilidade gastrointestinal, resultando na menor absorção de compostos como o colesterol. Neste estudo, pretende-se calcular a velocidade de reação da tiocolina com o 5-5'-ditiobis(2-ácido nitrobenzóico) (DTNB), através do método de Ellman, particularmente o aparecimento do ião 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) <sup>84</sup>, tendo este uma coloração amarela e o seu pico de absorvência característico a 405 nm (Figura 3.3).



**Figura 3.3** – Esquema representativo da reação do método de Ellman para determinação da atividade do enzima AChE, adaptado de <sup>86</sup>.

Para se determinar a inibição da atividade enzimática da AChE, usou-se o método descrito por Falé *et al* <sup>89</sup>. No ensaio, temos a *cuvette* de trás (branco) e a *cuvette* da frente com a amostra. Para o controlo adicionaram-se em ambas as *cuvettes* 325  $\mu\text{L}$  de tampão Tris 50 mM, pH = 8, 100  $\mu\text{L}$  de água *Milli-Q* e na *cuvette* de trás adicionaram-se 25  $\mu\text{L}$  do tampão Tris, enquanto na *cuvette* da frente o mesmo volume, mas da solução de AChE (1,33 U/mL). Incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente. Findo o tempo, adicionou-se a cada *cuvette* 75  $\mu\text{L}$  da solução de AChI (0,33 mg/mL em água *Milli-Q*) e 475  $\mu\text{L}$  da solução de DTNB (1,2 mg/mL em tampão Tris com sais (0,1 M NaCl e 0,02 M  $\text{MgCl}_2$ )). A absorvência foi lida no espectrofotómetro a 405 nm durante 4 minutos, com intervalos de 10 segundos. O valor da atividade inicial do enzima tem que se encontrar entre 0,10 e 0,12 UA/min para se poder determinar a percentagem de inibição das amostras. Para as amostras o procedimento é semelhante, sendo a única diferença que em vez de 100  $\mu\text{L}$  de água adicionou-se o mesmo volume da solução da amostra em estudo para uma concentração final de 1 mg/mL. Os ensaios foram sempre feitos em triplicado.

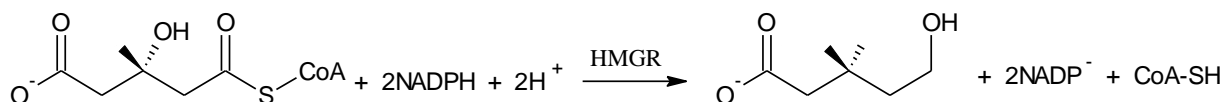
Para se calcular a percentagem de inibição da atividade do enzima na presença de cada uma das amostras usa-se a equação:

$$I_{\text{AChE}} (\%) = [(V_{\text{controlo}} - V_{\text{amostra}}) / V_{\text{controlo}}] \times 100 \quad [\text{Eq. 3.3}]$$

Na qual  $I_{\text{AChE}}$  diz respeito à percentagem de inibição da acetilcolinesterase,  $V_{\text{amostra}}$  é a velocidade da reação com a amostra (inibidor) e  $V_{\text{controlo}}$  é a velocidade da reação sem inibidor.

### 3.9.2 – Inibição da HMG-CoA Redutase (EC 1.1.1.34)

A HMG-CoA Redutase (HMGR) é o enzima responsável pela reação na qual a HMG-CoA é convertida em mevalonato e CoA, sendo esta relevante dado estar no centro da biossíntese de esteroides e terpenoides e, consequentemente, na produção de colesterol <sup>90</sup>. Este ensaio baseia-se no consumo de fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) pela subunidade catalítica da HMGR na presença do substrato de HMG-CoA (Figura 3.4), que pode ser medida pela diminuição da absorvência a 340 nm.



**Figura 3.4** – Representação esquemática da reação enzimática da HMGR, adaptado de <sup>91</sup>.

Para se determinar a inibição da atividade enzimática da HMGR, usou-se o método como sugerido pelo fornecedor do *kit*, com pequenas modificações. Em primeiro lugar, para se calcular a atividade enzimática sem inibidor, que corresponde à atividade máxima (100 %), adicionou-se 915 µL de tampão (1x), 20 µL de NADPH (16,67 mg/mL), 60 µL de HMG-CoA e 5 µL de HMGR (0,5 mg/mL). As absorvências aos tempos 0, 1, 2, 3, 4 e 5 minutos foram medidas no espectrofotómetro a 340 nm usando *cuvettes* de quartzo, permitindo fazer a regressão linear e obter a velocidade da reação. Para medir a atividade das amostras o procedimento foi idêntico exceto que em vez de 915 µL de tampão usou-se 815 µL mais 100 µL da amostra (inibidor), na concentração final de 1 mg/mL.

Para o cálculo da percentagem de inibição da atividade enzimática na presença da amostra recorreu-se à seguinte equação:

$$PI = 100 - [(V_{\text{extrato}} * 100) / V_{\text{controlo}}] \quad [\text{Eq. 3.4}]$$

Na qual **PI** diz respeito à percentagem de inibição do enzima,  $V_{\text{extrato}}$  à velocidade da reação com a amostra (inibidor) e  $V_{\text{controlo}}$  à velocidade da reação sem inibidor.

### 3.10 – Análise por Microscopia Eletrónica de Varrimento

Recorrendo ao SEM (do inglês “*scanning electron microscopy*”), analisámos a estrutura inicial da alga liofilizada, bem como os extratos da alga liofilizada cozida a 100 °C, com e sem mucilagens, e digerida 24 horas com suco pancreático. O pó das quatro amostras foi disperso cuidadosamente sobre uma fita de carbono de dois lados adjunto com as superfícies dos cilindros de alumínio. Estes cilindros metálicos foram cobertos com uma camada fina de ouro e as amostras metalizadas foram observadas num microscópio eletrónico de varrimento a uma voltagem de aceleração de 20 kV <sup>81</sup>.

### 3.11 – Ensaio em linhas celulares do carcinoma do cólon

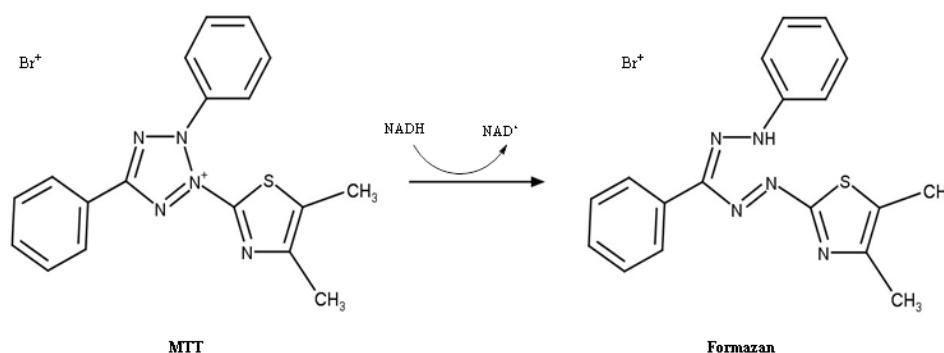
Durante este trabalho experimental utilizou-se a linha celular Caco-2 (ATCC<sup>®</sup>HTB-37), do adenocarcinoma colon-rectal. As células foram deixadas a crescer numa estufa com uma atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C, em meio RPMI suplementado com 10 % de FBS, 1 % de L-glutamina e 1 % de pen-strep. As células cresceram em frascos T25, tendo-se trocado o meio (6 mL) a cada 48h. Uma vez por semana, altura em que as células aderiram ao fundo e atingiram uma confluência de



aproximadamente 90 %, descarta-se o meio e lava-se as células com PBS 1x. Em seguida, adiciona-se 800  $\mu\text{L}$  de tripsina e deixa-se 5 minutos a incubar na estufa com o intuito de quebrar as ligações peptídicas que unem as células para as separar e soltar. Após os 5 minutos, volta-se a adicionar o meio, o qual inibe a tripsina, e voltam a ficar 48 h.

### 3.11.1 – Determinação da citotoxicidade nas células Caco-2

Para determinar a citotoxicidade, usou-se um método colorimétrico que consiste na redução de um composto de cor amarela, o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-1-il)-2,5-difenil-tetrazólio), originando como produto cristais de formazan, um composto roxo insolúvel em água e, como tal, recorre-se ao metanol para os dissolver e regista-se a absorvência a 595 nm. O enzima succinato desidrogenase é ativo apenas em células viáveis, atuando como doador de eletrões na redução do MTT em cristais de formazan (Figura 3.5) <sup>92</sup>. Deste modo, o MTT tem a capacidade de penetrar apenas nas células vivas e, conseqüentemente, quanto maior for a citotoxicidade do extrato, menor será o número de células viáveis e o valor de absorvência.



**Figura 3.5** – Estruturas químicas do MTT e do seu produto reduzido formazan, adaptado de <sup>92</sup>.

Segundo o método descrito por Ressaissi *et al* <sup>91</sup>, findo o tempo de incubação com a tripsina (ponto 3.11), são contadas o número de células viáveis num hemacitómetro, usando uma solução de azul de tripano, o qual irá corar a membrana das células mortas, pelo que se procede à contagem das células não coradas. É então preparada uma suspensão celular, em meio RPMI, com uma concentração final de  $50 \times 10^4$  células/mL, da qual se adicionou 100  $\mu\text{L}$  em cada um dos 96 poços da microplaca onde foi cultivada. A microplaca foi incubada por 48 h numa estufa a 37 °C e 5 % de  $\text{CO}_2$ .

Feitas as 48 h de incubação, é retirado o meio de cultura dos poços e aplicado em cada poço 100  $\mu\text{L}$  da solução dos extratos W100 e W24, ambos com e sem mucilagens, a diferentes concentrações (0,1 mg/mL e 0,5 mg/mL), dissolvida em meio RPMI ou do branco que será constituído somente pelo meio RPMI e servirá como controlo negativo. A microplaca é incubada novamente, nas mesmas condições, durante 24 h.

Após o término do tempo de incubação, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com 100  $\mu\text{L}$  de PBS 1x antes de serem aplicados 100  $\mu\text{L}$  da solução de MTT (0,5 mg/mL), dissolvido igualmente em meio RPMI. A microplaca é levada a incubar uma última vez durante 3 h.

Por fim, retira-se a solução de MTT e adicionam-se 100  $\mu\text{L}$  de metanol a cada um dos poços para dissolver os cristais de formazan. Lê-se a absorvência a 595 nm com referência a 630 nm num leitor de microplacas. A percentagem de morte celular é calculada através da equação:

$$MC (\%) = 100 - (A_{\text{amostra}} / A_{\text{controle}}) \times 100 \quad [\text{Eq. 3.5}]$$

Na qual **MC (%)** diz respeito à percentagem de morte celular, **A<sub>amostra</sub>** é a absorvência registada para as células em contacto com as soluções dos diversos extratos a diferentes concentrações e **A<sub>controle</sub>** é a absorvência registada para as células em contacto somente com o meio RPMI.

### 3.11.2 – Estudos da influência do colesterol em células Caco-2

Seguindo a metodologia de Ressaissi *et al*<sup>91</sup>, as células Caco-2 que estavam em cultura (ponto 3.11) foram transferidas para *inserts* com um diâmetro de 12 mm e poro de tamanho 0,4 µm, em placas Transwell de 12 poços, a uma densidade de  $2 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. As monocamadas celulares formaram-se após duas semanas, sendo que a integridade das mesmas foi avaliada através do valor de TEER (resistência elétrica transepitelial) com o aparelho de medição Millicell ERS-2 V-Ohm da Millipore (Darmstadt, Alemanha). As membranas são consideradas adequadas quando o valor de TEER é superior a 250 Ω/cm<sup>2</sup>. Verificadas estas condições, as células foram primeiramente lavadas com PBS. Após este procedimento, foram aplicados em todos os poços 1,5 mL de HBSS na parte basolateral e 0,5 mL na parte apical da solução de amostra em estudo, sendo que cada uma foi realizada em duplicado. Por conseguinte, as soluções com o colesterol (5 mM), a alga liofilizada (0,5 mg/mL) mais o colesterol, W100 (0,5 mg/mL) mais o colesterol, WDig (0,5 mg/mL) mais o colesterol, colesterol mais o ezetimibe (fármaco cujo efeito é reduzir a absorção de colesterol no intestino) (0,1 mM) e, por último, a junção do colesterol mais o ezetimibe e W100. Feito isto, as células foram incubadas por um período de 6 horas a 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub>.

### 3.11.3 – Eletroforese bidimensional

Prosseguindo desde o fim das 6 horas de incubação (ponto 3.11.2), retiraram-se as soluções das amostras de ambos os lados e as células foram raspadas duas vezes usando 500 µL de PBS 1x em cada um dos doze *inserts*, sendo recolhidas para um *eppendorf*. Procedeu-se então à centrifugação das células a 10000 g, durante 5 minutos, e descartou-se o PBS. De seguida, ressuspendeu-se as células com 50 µL de tampão lise (5,25 g de ureia; 1,9 g de tioureia; 0,5 g de CHAPS; 77 mg de DTT; 12,5 mL de H<sub>2</sub>O) mais 250 µL de água destilada. Em seguida, as células foram lisadas por sonicação, durante 10 minutos, e centrifugadas a 10000 g durante 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante (aproximadamente 300 µL) e recorreu-se ao protocolo fornecido pela GE Healthcare 2-D Clean-up kit.

Brevemente, adiciona-se 300 µL de agente precipitante, agita-se no vórtex e incuba-se no gelo durante 15 minutos. Adiciona-se 300 µL de co-precipitante e centrifuga-se a 13000 g durante 5 minutos, descartando-se o sobrenadante. Adiciona-se 40 µL de co-precipitante no topo do precipitado e incuba-se no gelo mais 5 minutos. Volta a centrifugar-se nas mesmas condições, descarta-se novamente o sobrenadante e adiciona-se 25 µL de água *Milli-Q*, agitando-se no vórtex até o precipitado se dispersar. Adiciona-se 1 mL de tampão de lavagem e 5 µL de aditivo de lavagem. Mais uma vez agita-se no vórtex e os *eppendorfs* são incubados a - 20 °C durante 30 minutos, sendo que a cada 10 minutos usa-se o vórtex para agitar durante 30 segundos. Centrifuga-se a descarta-se o sobrenadante.

Para a realização da eletroforese 2D, o precipitado foi ressuscitado em 125 µL de tampão de rehidratação (4,2 g de ureia; 1,52 g de tioureia; 0,2 g de CHAPS; 60,8 µL de IPG buffer; 40 µL de azul de bromofenol (1 %); 10 mL H<sub>2</sub>O) com 1 % de DTT (w/v) e incubou-se à temperatura ambiente durante 1 hora. Aplicou-se a amostra no sarcófago 7 cm Immobiline DryStrip pH 3-11 NL e cobriu-se com 500 µL de óleo de imersão. A Immobiline DryStrip correu nas seguintes condições:

**Tabela 3.2** – Programa #3 da eletroforese para *strips* de 7 cm e pH 3-11.

1	12 h	30 V
2	100 V	150 vh
3	250 V	250 vh
4	1000 V	1000 vh
5	2050 V	2500 vh
6	8000 V	30 min gradiente
7	8000 V	12000 vh

Findo este passo, as tiras foram retiradas dos sarcófagos e incubadas em 5 mL no tampão de equilíbrio (36,1 g de ureia; 5 mL de tampão Tris-HCl 1,5 M, pH = 8,8; 34,5 mL de glicerol; 2 g de SDS; 200 µL de azul de bromofenol (1 %); 100 mL H<sub>2</sub>O) com 1 % de DTT (w/v), durante 15 minutos à temperatura ambiente. Após este tempo, as tiras foram transferidas para outro *falcon* com o tampão de equilíbrio novamente porém com 2,5 % de iodoacetamida (w/v) e incubadas outra vez durante 15 minutos à temperatura ambiente.

A segunda dimensão foi executada num gel de bis acrilamida 12 % (6,8 mL de acrilamida/bis; 5 mL de tampão Tris-HCl 1,5 M, pH = 8,8; 0,2 mL SDS (10 %); 7,9 mL H<sub>2</sub>O; 0,2 mL de PSA (10 %); 0,04 mL de TEMED), durante aproximadamente 2 horas a 100 V. Dentro da tina onde correu a eletroforese usou-se tampão de Laemmli (3,03 g de Tris; 14,41 g de glicina; 1 g de SDS; 1 L de H<sub>2</sub>O). Por cima das *strips* colocou-se uma solução vedante de agarose (10 mL de tampão de Laemmli; 0,05 g de agarose; 20 µL de azul de bromofenol (1 %)). As proteínas obtidas nos géis foram coradas com nitrato de prata de acordo com o procedimento escrito em Yan *et al.* (2000)<sup>93</sup>. Na tabela 3.3 encontram-se resumidos os passos essenciais à coloração dos géis:

**Tabela 3.3** – Protocolo de coloração dos géis de acrilamida com nitrato de prata.

Passo	Solução	Tempo (min)
Fixação	12,5 mL ácido acético; 50 mL metanol; 62,5 mL água <i>Milli-Q</i>	15
Fixação	12,5 mL ácido acético; 50 mL metanol; 62,5 mL água <i>Milli-Q</i>	15
Sensibilização	37,5 mL metanol; 5 mL tiosulfato de sódio 5 % (m/v); 8,5 g acetato de sódio; 82,5 mL água <i>Milli-Q</i>	30
Lavagem	250 mL água <i>Milli-Q</i>	5
Lavagem	250 mL água <i>Milli-Q</i>	5
Lavagem	250 mL água <i>Milli-Q</i>	5
Marcação com prata	0,625 g nitrato de prata; 250 mL água <i>Milli-Q</i>	20
Lavagem	250 mL água <i>Milli-Q</i>	1
Lavagem	250 mL água <i>Milli-Q</i>	1
Revelação*	6,25 g carbonato de sódio, 100 µL formaldeído, 250 mL água <i>Milli-Q</i>	
Paragem	3,65 g ácido etilenodiamina tetra-acético (EDTA), 250 g água <i>Milli-Q</i>	30
Lavagem	250 mL água <i>Milli-Q</i>	5
Lavagem	250 mL água <i>Milli-Q</i>	5
Lavagem	250 mL água <i>Milli-Q</i>	5

\*No passo da revelação a solução foi substituída assim que fosse visível algum depósito de modo a diminuir o fundo do gel por marcação inespecífica.

### 3.12 – Ensaios em linhas celulares do carcinoma hepatocelular

Durante este trabalho experimental utilizou-se a linha celular Hep-G2 (ATCC®HTB-8065), do carcinoma hepatocelular humano. As células foram deixadas a crescer numa estufa com uma atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C, em meio RPMI suplementado com 10 % de FBS, 1 % de L-glutamina e 1 % de pen-strep. As células cresceram em frascos T75, tendo-se trocado o meio (10 mL) a cada 48h. Uma vez por semana, altura em que as células aderiram ao fundo e atingiram uma confluência de aproximadamente 90 %, descarta-se o meio e lava-se as células com PBS 1x. Em seguida, adiciona-se 1,5 mL de tripsina e deixa-se 5 minutos a incubar na estufa com o intuito de quebrar as ligações peptídicas que unem as células para as separar e soltar. Após os 5 minutos, volta-se a adicionar o meio, o qual inibe a tripsina, e voltam a ficar 48h.

#### 3.12.1 – Determinação da citotoxicidade nas células Hep-G2

Este procedimento experimental é idêntico ao das células Caco-2 explicado no ponto 3.11.1, exceto que após aplicação da solução de MTT espera-se 2 horas, não 3 horas e os extratos aplicados foram o W100 e WDig nas concentrações 0,1; 0,2 e 0,5 mg/mL.

#### 3.12.2 – Extração e quantificação proteica

Seguindo o protocolo “2-D Quant kit” fornecido pela GE Healthcare, começou-se por preparar o reagente de coloração que consiste em misturar 100 partes do reagente de cor A com 1 parte do reagente de cor B. Para se efetuar a curva de calibração preparou-se seis *ependorfs* em concentrações crescentes da solução de albumina de soro bovino (BSA) com 0, 5, 10, 15, 20 e 25 µL. À parte prepara-se também um *ependorf* contendo 20 µL da amostra. Em seguida, adiciona-se 500 µL do precipitante a cada *ependorf* e incuba-se à temperatura ambiente durante 3 minutos. Após este tempo adiciona-se 500 µL de co-precipitante, mistura-se por inversão e centrifuga-se 5 minutos a 10000 g. Descarta-se o sobrenadante. Adiciona-se 100 µL da solução de cobre e 400 µL de água destilada. Leva-se ao vórtex brevemente para dissolver a proteína precipitada. Adiciona-se 1 mL do reagente de coloração e deixa-se a incubar durante 20 minutos. Por fim, lê-se a absorvência a 480 nm usando água como referência. Com isto obtém-se a reta de calibração (Anexo 2) e com a equação obtida determinamos a concentração da proteína.

#### 3.12.3 – Eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional

Para estudar o perfil proteico da linha celular Hep-G2, usou-se os frascos T75 onde se cresceram as células até se atingir uma confluência de 90 %. Um dos frascos foi utilizado como controlo, em que se adicionou meio RPMI sem FBS, e aos outros adicionaram-se as amostras W100 (0,5 mg/mL) e WDig (0,2 mg/mL), dissolvidas no mesmo meio. Efetuaram-se dois estudos simultâneos. No primeiro, os frascos T75 foram deixados a incubar durante 4 horas na estufa a 37 °C e 5 % CO<sub>2</sub>, uma vez que essa é aproximadamente a duração da digestão no ser humano. No segundo ensaio, os frascos T75 foram deixados a incubar nas mesmas condições, mas durante 24 horas devido não só ao efeito cumulativo, como também ao trânsito intestinal e ao facto de certos compostos serem absorvidos no cólon. Findo este tempo, retirou-se o meio, adicionou-se 500 µL de água destilada e raspou-se as células, que foram recolhidas para um *ependorf* e lavadas duas vezes com água destilada. De seguida, centrifugou-se durante 5 minutos a 10000 g, descartou-se o sobrenadante e repetiu-se este processo três vezes para garantir que se retiraram todas as células do frasco T75. Congelou-se e foi levado a liofilizar. Posteriormente, adicionou-se 500 µL de tampão lise (5,05 mL de H<sub>2</sub>O; 1,15 mL de tampão Tris-HCl 0,5 M; 61 mg de DTT, pH = 6,8) e as células foram lisadas por sonicação durante 10 minutos. Centrifugou-se 5 minutos a 10000 g recolhendo-se o sobrenadante. Ao

sobrenadante das diferentes amostras em estudo quantificou-se a proteína, conforme descrito no ponto 3.12.2, e prepararam-se soluções com 20 µg de proteína diluídas em tampão de aplicação de amostra (5,05 mL de H<sub>2</sub>O; 1,15 mL de tampão Tris-HCl 0,5 M, pH = 6,8; 61 mg de DTT; 1,1 mL de glicerol; 2 mL SDS 10 %; 300 µL de azul de bromofenol (0,2 %)). Os *ependorfs* foram então levados a ferver 5 minutos. Os géis de eletroforese foram preparados utilizando-se um gel de concentração de 4 % e um gel de resolução de 10 % acrilamida-bis, onde se aplicou 5µL de marcador de peso molecular e 20 µL de cada uma das amostras. O tampão de eletroforese que se usou é composto por Tris-HCl 0,0025 M, contendo 0,192 M de glicina, SDS 0,1 %, a pH = 8,3. A corrida efetuou-se durante 1 hora e 45 minutos, aproximadamente, com uma diferença de potencial de 100 V. Findo este tempo, usou-se uma solução de Coomassie R-250 40 %, metanol 40 % e ácido acético glacial 10 % para corar os géis durante 1 hora. Depois dessa hora retirou-se essa solução e adicionou-se uma solução para descorar composta por ácido acético glacial 10 %, metanol 40 % e água destilada 50 % durante mais 1 hora. Por fim, registou-se fotograficamente os géis utilizando o aparelho *ImageQuant*.

### 3.13 – Análise estatística

Ao longo do trabalho, os resultados são expressos como média ± desvio padrão. As diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas pela análise de variância de um fator (ANOVA), disponível no *software* Microsoft Office 2013<sup>®</sup>. No tratamento estatístico, utilizou-se um nível de probabilidade de  $p \leq 0,05$  como uma diferença significativa.



## **4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

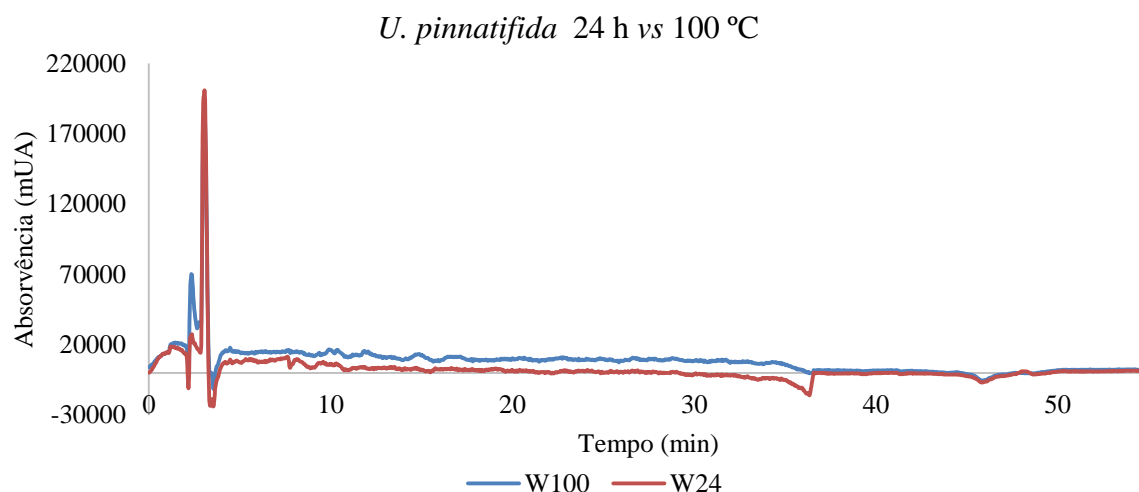




Com o intuito de estudar as atividades biológicas da alga marinha *U. pinnatifida* procedeu-se à quantificação dos fenóis totais dado que estes são os principais compostos que afetarão as bioatividades em estudo, nomeadamente a atividade antioxidante (ao estudar a capacidade de redução do radical DPPH), inibição da acetilcolinesterase (AChE) e inibição da HMG-CoA Redutase (HMGR). Vai proceder-se também à análise cromatográfica de cada extrato de *U. pinnatifida* e à análise por espectrometria de massa do W100 e WDig numa tentativa de identificar os compostos existentes em cada um deles e o seu impacto nas atividades biológicas. Para além disso, estudar-se-á citotoxicidade e os perfis proteicos em células Hep-G2 e em células Caco-2 (nestas últimas em conjugação com o colesterol e o ezetimibe).

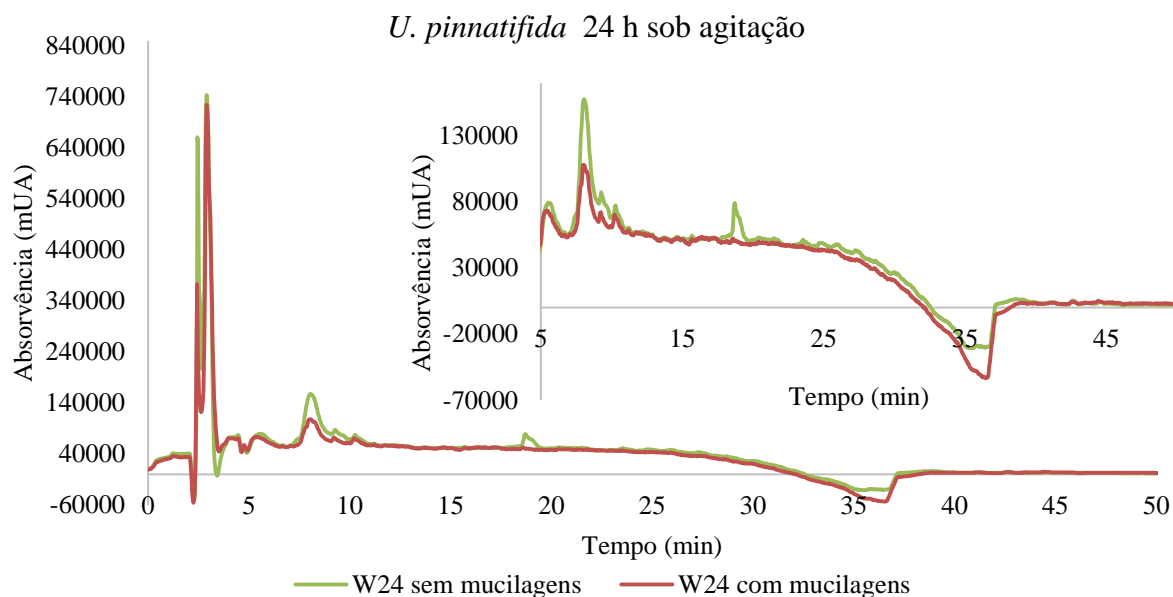
#### 4.1 – Caracterização dos extratos de *U. pinnatifida* por HPLC-DAD

A *U. pinnatifida* é uma alga castanha consumida há já alguns anos nos países asiáticos e o seu consumo tem sido cada vez mais global. Como tal, tem sido investigada pelas suas possíveis atividades biológicas. Para um estudo preliminar, preparou-se uma solução de 1 mg/mL de cada extrato para ser analisado por HPLC-DAD. Os cromatogramas obtidos são os que se seguem e as condições de análise são as descritas no ponto (3.4.1).



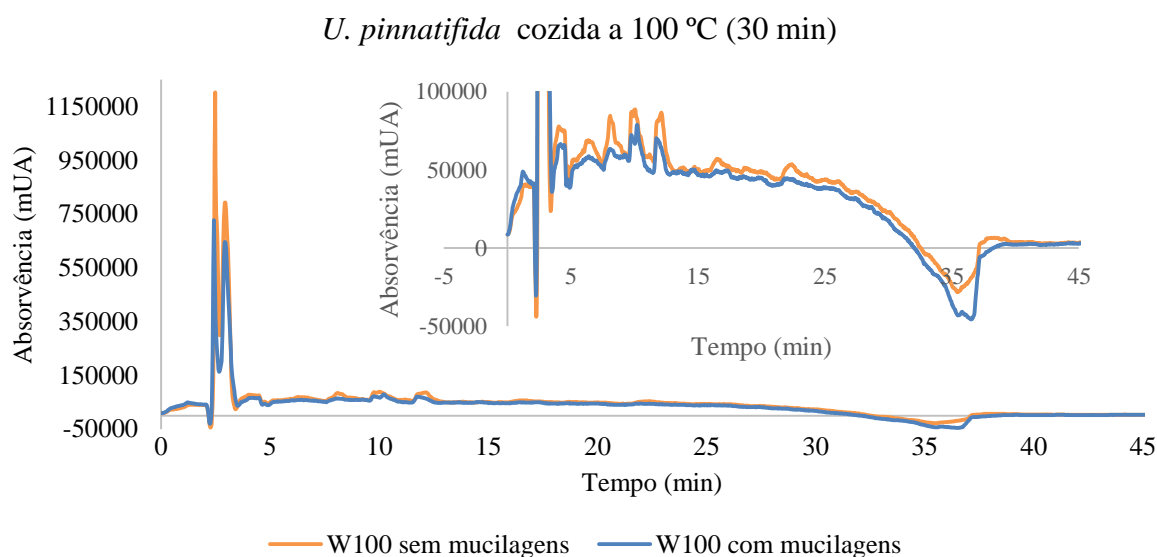
**Figura 4.1** – Cromatograma de HPLC-DAD dos extratos W100 e W24, na concentração de 1 mg/mL.

Ao observarmos o cromatograma presente na Figura 4.1 das duas extrações vemos uma grande semelhança, pelo que podemos deduzir que os mesmos compostos foram eluídos nos dois casos. No entanto, existe uma maior absorvência no extrato W100, o que denota uma maior quantidade extraída dos compostos em questão. De salientar a presença de dois picos de maior intensidade. O primeiro na ordem dos 2,4 minutos de tempo de retenção, no qual W100 tem um intensidade cerca de duas vezes superior, significando uma maior quantidade desse composto. O segundo na ordem dos 2,9 minutos de tempo de retenção e o pico com maior absorvência ( $\pm 210000$  mUA), com intensidade relativamente idêntica nos dois extratos. De resto não se registam picos significativos, mantendo-se a absorvência em valores baixos, indicando que a extração de compostos não se revelou muito eficiente.



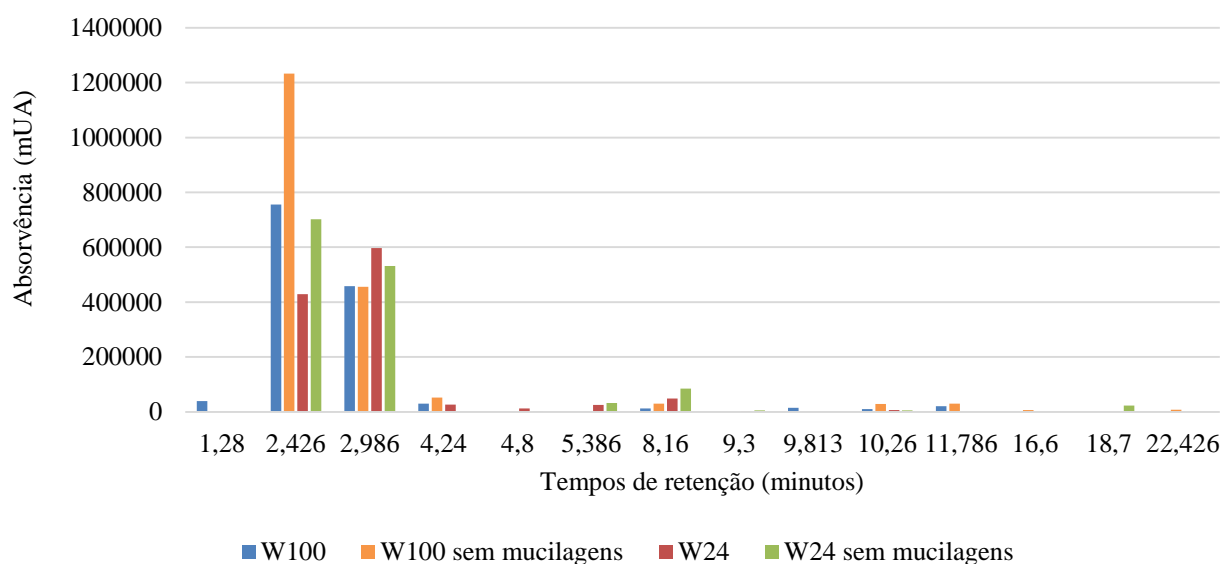
**Figura 4.2** – Cromatograma de HPLC-DAD do extrato da alga W24 com mucilagens e W24 sem mucilagens, na concentração de 5 mg/mL.

Analisando o cromatograma do extrato W24 com e sem mucilagens (Figura 4.2), observa-se a existência de um pico proeminente em ambos os extratos aos 8,16 minutos e outro aos 18,7 minutos, embora o último seja exclusivo do extrato sem mucilagens. No que diz respeito aos picos em si, o do extrato sem mucilagens apresenta uma maior absorvência, indicando que a purificação do extrato foi bem-sucedida, dado ter aumentado a quantidade desse composto. Observa-se novamente os dois picos iniciais aos tempos de retenção 2,4 e 2,9 minutos, também registados na Figura 4.1, nos quais o pico aos 2,9 minutos possui a mesma absorvência em ambos os extratos. Contudo no pico a 2,4 minutos o extrato W24 sem mucilagens revelou um aumento da intensidade (cerca de duas vezes superior), significando uma melhor extração desse composto, após purificação do extrato W24, retirando-se as mucilagens.



**Figura 4.3** – Cromatograma de HPLC-DAD do extrato W100 com mucilagens e W100 sem mucilagens, na concentração de 5 mg/mL.

Comparando os cromatogramas do extrato W100 com e sem mucilagens (Figura 4.3), podemos observar a existência de quatro picos distintos aos 5,386; 9,813; 10,26 e 11,786 minutos, significando a extração de novos compostos, uma vez que ainda não se tinham registados picos a estes tempos de retenção. Apesar de serem novos compostos, a sua extração não é muito eficiente pois a sua absorvência é relativamente baixa, revelando uma pouca quantidade desses compostos extraídos. Os picos aos tempos de retenção 2,4 e 2,9 minutos, que também se registavam na Figura 4.1 e na Figura 4.2, continuam presentes. No entanto, neste caso o pico com maior intensidade é aos 2,4 minutos em vez de aos 2,9 minutos, indicando uma maior quantidade desse composto. Mais uma vez, o extrato que sofreu purificação, ou seja, que se retiraram as mucilagens, possui uma maior absorvência (cerca de 1,5 vezes superior). Quer isto dizer que a extração de compostos foi mais eficaz nos extratos sem mucilagens (em ambos os casos W100 e W24), o que pode sugerir que as mucilagens podem aprisionar de alguma forma compostos, não permitindo a sua extração. Por conseguinte, ao se retirar as mucilagens permitimos uma melhor extração desses compostos.

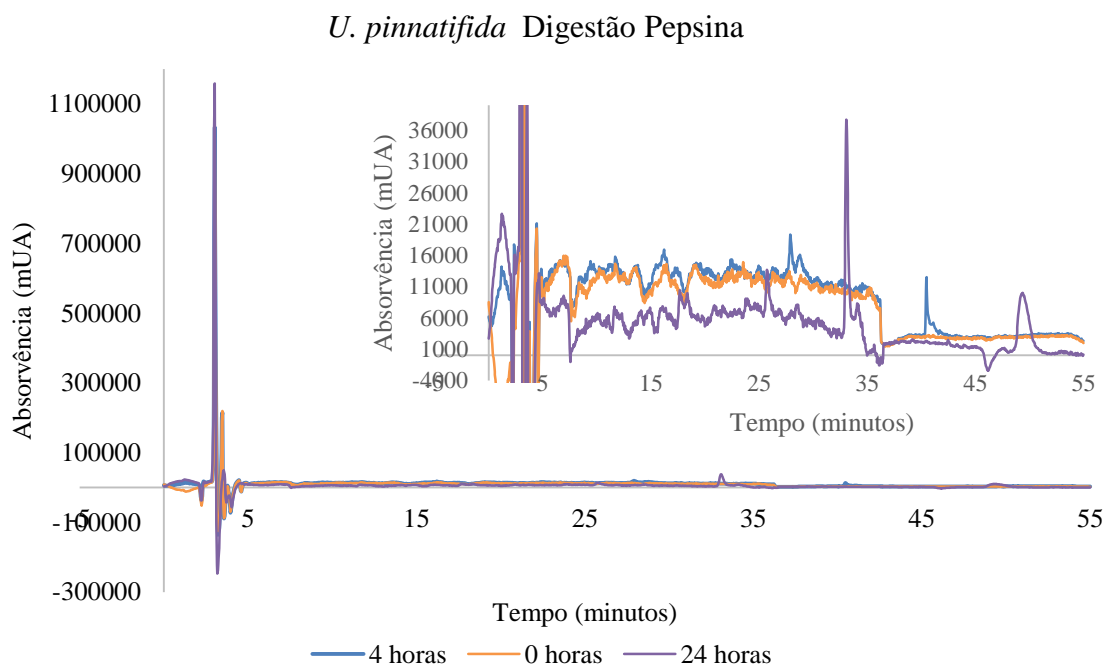


**Figura 4.4** – Comparação da intensidade da absorvência obtida aos diversos tempos de retenção para o extrato de *U. pinnatifida* W100, W100 sem mucilagens, W24 e W24 sem mucilagens, a uma concentração de 5 mg/mL.

Analisando as áreas dos picos maioritários dos diferentes extratos (Figura 4.4), verifica-se notoriamente que existem dois tempos de retenção que obtiveram valores de absorvência muito superiores, sendo eles o 2,426 e 2,986 minutos. Tal indica uma extração do composto a esse tempo de retenção em muito maior quantidade do que nos restantes. Cada um dos extratos apresenta um valor elevado de absorvência em ambos os tempos de retenção, contudo W100 sem mucilagens apresenta um valor aproximadamente duas vezes superior aos restantes, apontando para uma maior quantidade desse dado composto. Regista-se também vários outros tempos de retenção comuns a quase todos os extratos como 4,24 e 8,16 minutos, sendo estes compostos extraídos em todos os casos. No entanto, exceto os tempos de retenção 2,4 e 2,9 minutos, os valores de absorvência são baixos pelo que podemos inferir que a extração dos compostos aos outros tempos de retenção indicados não são tão eficientes, não se conseguindo portanto extrair uma quantidade considerável.

Com o intuito de estudar o que acontece à alga quando sujeita à digestão no nosso organismo, neste caso em particular no estômago, e saber se novos compostos são extraídos que possam ter impacto nas atividades biológicas, foi efetuada digestão com suco gástrico de 4 horas. De um ponto de

vista biotecnológico, para ver se mais compostos eram extraídos quando a digestão atuava durante um maior período de tempo, foi então feita também a digestão de 24 horas (Figura 4.5). Simultaneamente, para se estudar o que acontece à alga quando sujeita à digestão no caso do intestino, efetuou-se a digestão com suco pancreático, tirando-se alíquotas às 0, 4 e 24 horas (Figura 4.6).

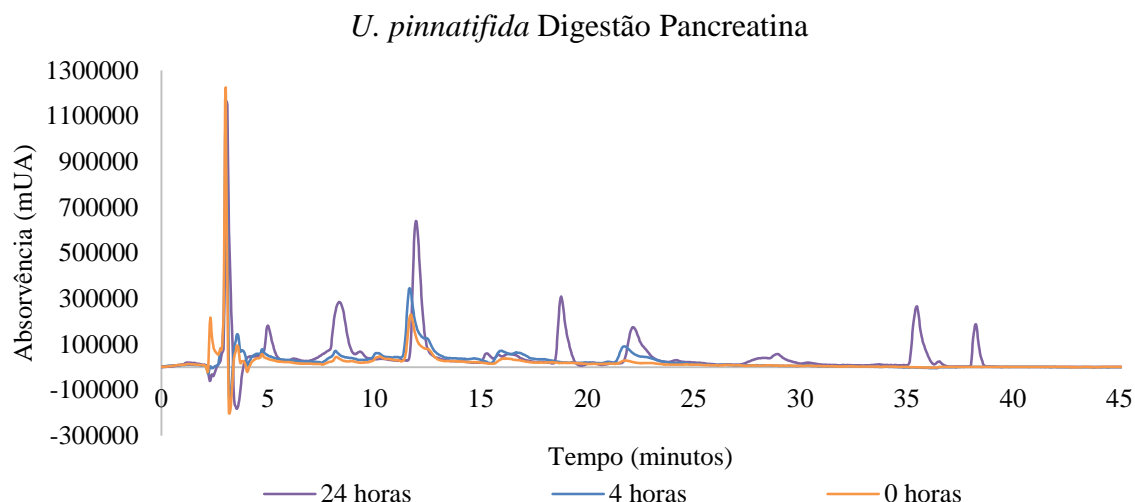


**Figura 4.5** – Cromatograma de HPLC-DAD do extrato da alga *U. pinnatifida* quando efetuada a digestão gástrica (com pepsina) aos tempos 0, 4 e 24 horas, na concentração de 5 mg/mL.

Fazendo a distinção numa primeira instância entre a digestão de 0 horas e 4 horas, podemos observar que os valores de absorvência estão bastante equiparados, mostrando que a quantidade de compostos extraídos é semelhante (Figura 4.5). A grande diferença entre estes dois cromatogramas está na existência de um pico proeminente ao tempo de retenção 40,45 minutos, exclusivo da digestão de 4 horas, sendo indicador da extração de um novo composto.

Importante de salientar que em vez de existirem os dois picos iniciais de grande absorvência aos tempos 2,4 e 2,9 minutos, regista-se apenas um pico aos 3,01 minutos cuja absorvência é bastante superior aos dos extratos W100 e W24 ( $\pm 1100000$  mUA), indicando uma grande quantidade do composto extraído a esse tempo de retenção.

Passando agora à distinção da digestão gástrica de 24 horas, podemos observar claramente uma diminuição geral na absorvência o que denota uma menor quantidade de extração dos compostos. No entanto, ao contrário do que ocorre na digestão de 4 horas, o pico que aparecia ao tempo de retenção de 40,45 minutos não está presente, pelo que podemos deduzir que esse composto não é extraído quando prolongamos a digestão além das 4 horas. No entanto, a digestão de 24 horas apresenta dois picos proeminentes característicos. Um por volta dos 32,93 minutos e outro nos 49,49 minutos. Tal é indicador da presença de dois novos compostos que só são extraídos quando a digestão é mais prolongada.

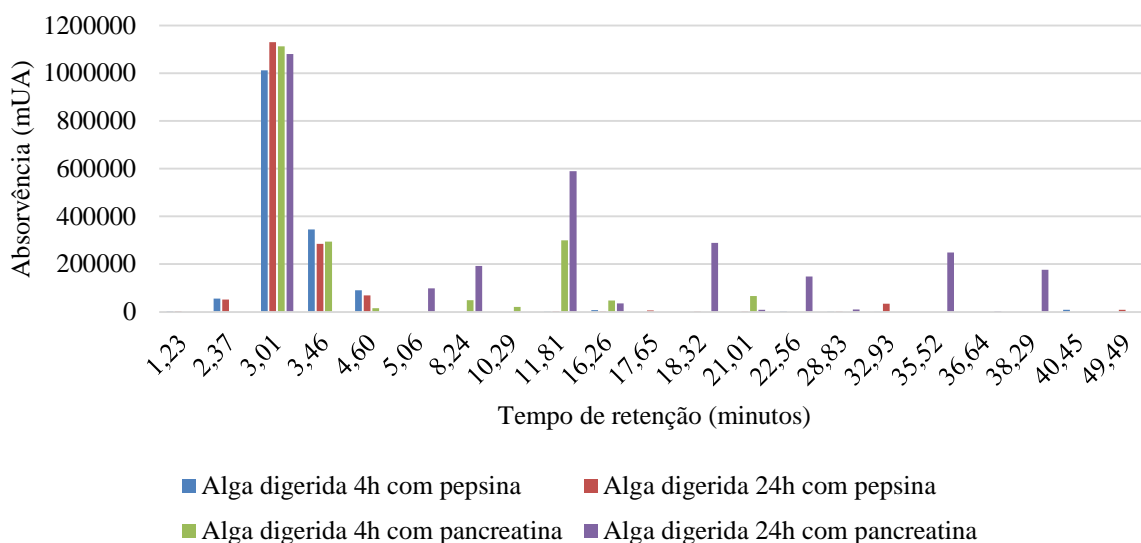


**Figura 4.6** – Cromatograma de HPLC-DAD do extrato da alga *U. pinnatifida* quando efetuada a digestão pancreática (com pancreatina) aos tempos 0, 4 e 24 horas, na concentração de 5 mg/mL.

Numa primeira instância, ao comparar a digestão de 0 h e 4 h, vemos que o cromatograma em si apresenta os mesmos picos, sendo praticamente sobreponíveis um no outro, dando-nos portanto a informação de que os compostos extraídos nos dois são idênticos (Figura 4.6). A diferença entre os dois reside apenas no facto de que na digestão de 4 h é possível observar uma maior absorvência, o que denota, como já foi explicado, uma maior quantidade do composto em questão na amostra.

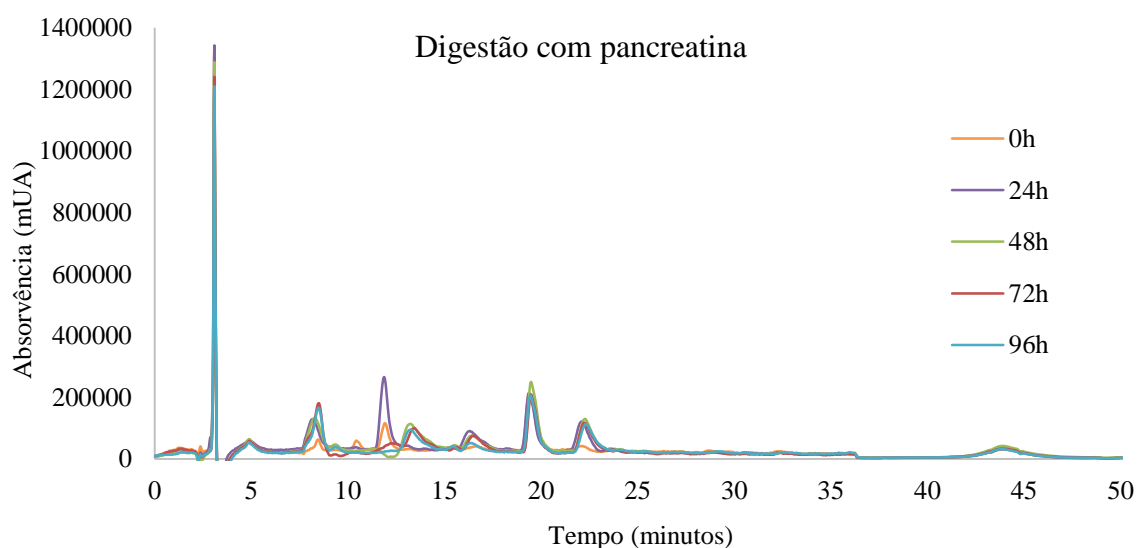
Verifica-se novamente que não existem os dois picos iniciais que existiam nos extratos W100 e W24, mas sim um pico inicial bastante superior ao tempo de retenção 3,01 minutos como acontecia na digestão com suco gástrico. Também no caso da digestão pancreática o pico ronda o valor de absorvência de 1100000 mUA.

A grande relevância surge quando efetuamos a digestão durante 24 h. Existe uma grande diferença entre esta e as outras duas anteriores. Não só existem picos muito mais proeminentes, isto é, com uma absorvência superior, mas também surgem quatro novos picos que antes não se manifestavam, nomeadamente aos 18,32; 28,83; 35,52 e 38,29 minutos, aproximadamente. A combinação destes dois fatores revela uma maior quantidade e, portanto, uma melhor eficiência da extração, como também o aparecimento de novos compostos.



**Figura 4.7** – Comparação da intensidade da absorvência obtida a diversos tempos de retenção para a *U. pinnatifida* digerida 4 horas com pepsina, 24 horas com pepsina, 4 horas com pancreatina e 24 horas com pancreatina, a uma concentração de 1 mg/mL.

Ao analisarmos estes resultados (Figura 4.7), vemos um tempo de retenção com valores claramente muito mais elevados que nos restantes que é a 3,01 minutos. Existe um composto aqui que é extraído em quantidades muito maiores e existe em todos os quatro extratos. Para além deste tempo de retenção, aos 3,46 minutos existem novamente valores elevados de absorvência indicando extração considerável de um composto, o qual é comum a todos os extratos menos ao da alga digerida 24 horas com pancreatina. No entanto, ao longo dos vários tempos de retenção, vemos que consistentemente esse mesmo extrato (WDig) não só está presente na grande maioria (5,06; 11,81; 18,32; 22,56; 35,52; 38,29), como também possui um valor de absorvência considerável em comparação com os restantes extratos e tempos de retenção. Face a isto podemos prossupor que, quando *U. pinnatifida* é sujeita a uma digestão pancreática por cerca de 24 horas, são extraídos novos compostos e a quantidades significativas que poderão ter importantes atividades biológicas.



**Figura 4.8** – Cromatograma de HPLC-DAD do extrato da alga *U. pinnatifida* quando efetuada a digestão pancreática aos tempos 0, 24, 48, 72 e 96 horas, na concentração de 1 mg/mL.

Tendo em conta o resultado do cromatograma anterior e de um ponto de vista biotecnológico, procedeu-se à realização da digestão pancreática durante 5 dias, tirando-se alíquotas a cada dia e no tempo 0.

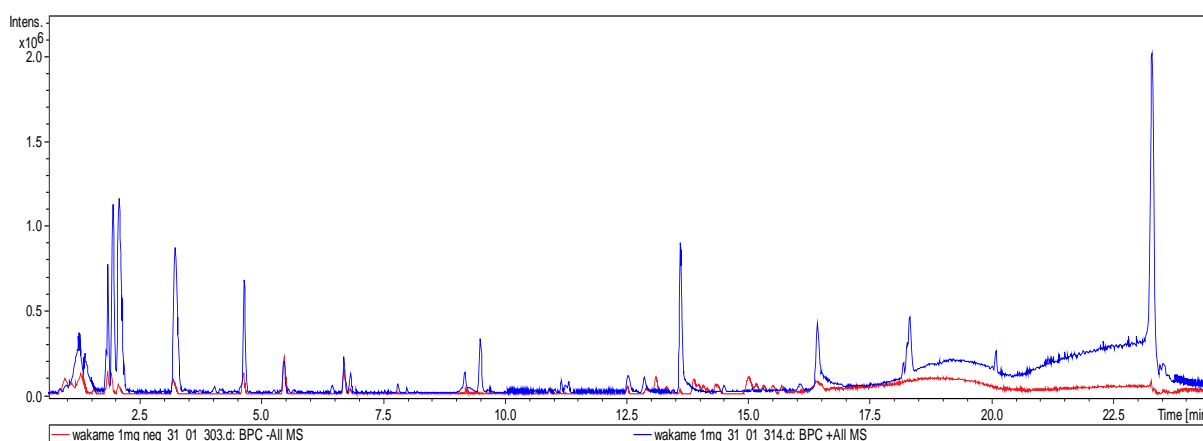
Podemos observar que o cromatograma (Figura 4.8) no que diz respeito aos picos, com exceção de 0 horas, são todos coincidentes pelo que não há a obtenção de um novo composto em nenhum dos casos. A única ligeira diferença prende-se com a altura dos determinados picos, indicando uma maior concentração do composto extraído que é diretamente proporcional à absorvência. O extrato de 24 horas mostrou-se ser o que tem maior absorvência no geral, consequentemente não prosseguimos com a análise dos outros extratos com mais tempo de digestão.

Face a estes resultados decidimos proceder com a determinação das atividades biológicas dos extratos W24, com e sem mucilagens, W100, com e sem mucilagens, e WDig.

## 4.2 – Identificação de compostos de *U. pinnatifida* por LC-MS

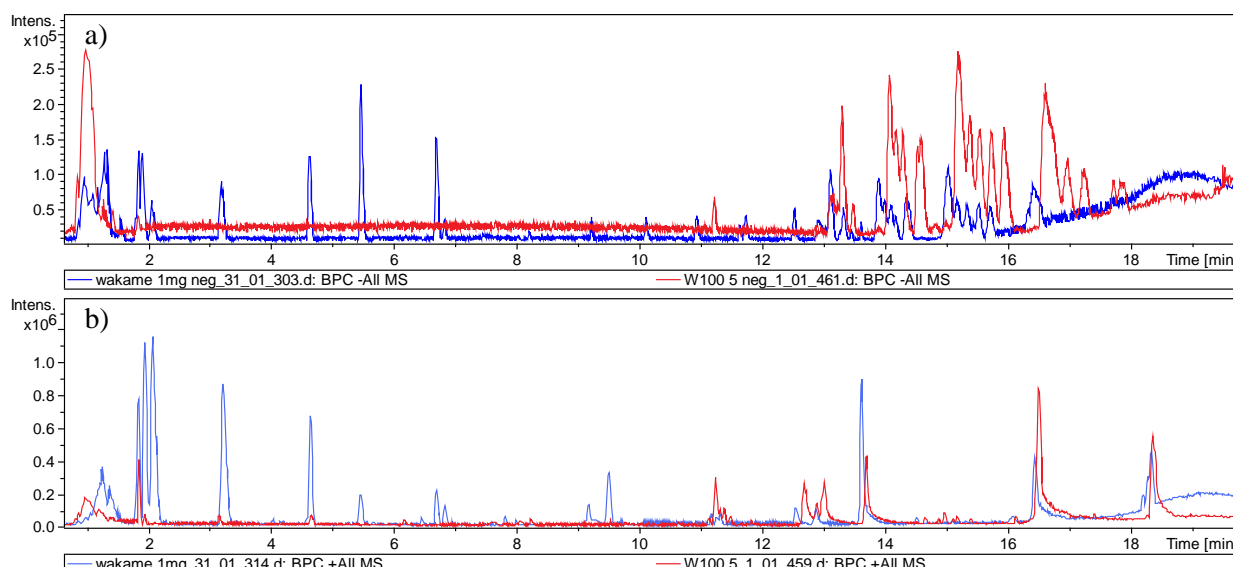
Após a análise dos vários extratos de *U. pinnatifida* por HPLC-DAD, procedeu-se à análise por LC-MS/MS do WDig e do W100 com o intuito de se identificar os compostos bioativos responsáveis pela atividade biológica desta alga marinha. O método utilizado durante as corridas está descrito no ponto 3.5. É importante salientar que na bibliografia esta alga é documentada como tendo quantidades consideráveis de compostos fenólicos, com ênfase nos florotaninos, e de fucoxantina, o pigmento carotenóide característico destas algas castanhas<sup>13,23</sup>.

Por um lado, analisou-se o W100 (5 mg/mL), pois este foi o que obteve melhores atividades biológicas, nomeadamente a melhor atividade antioxidante e a maior percentagem de inibição da AChE e da HMGR. Por outro, analisou-se o extrato digerido (1 mg/mL), uma vez que no cromatograma proveniente do HPLC-DAD são visíveis picos que não se registaram nos outros extratos, sugerindo assim o aparecimento de novos compostos. Na Figura 4.9 estão representados os cromatogramas do pico base (BPCs) de *U. pinnatifida* obtidos por ESI em modo positivo e negativo. Em anexo encontram-se os BPCs do extrato digerido em comparação com a água, ou seja, o branco em modo negativo e positivo (Anexos 5 e 6, respetivamente).



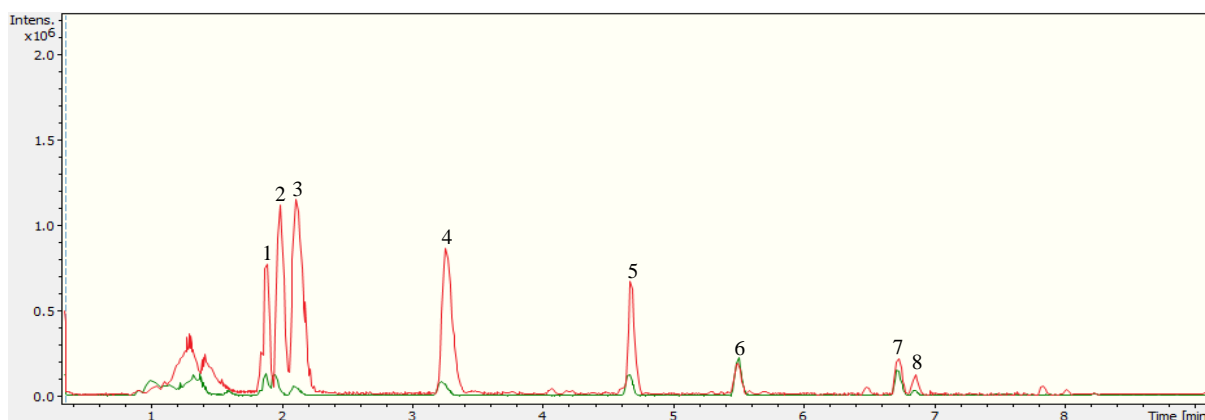
**Figura 4.9** – Cromatogramas do pico base do WDig obtidos por ESI em modo negativo (vermelho) e positivo (azul).

Comparando os BPCs dos extratos W100 e WDig obtidos por ESI em modo negativo e positivo (Figura 4.10a e 4.10b), observa-se a existência de quatro picos maioritários que são comuns a ambas as amostras, mas que no caso do extrato digerido são extraídos em quantidade superior. De facto, os picos do WDig, apesar de ter sido analisado numa concentração cinco vezes inferior, apresentam de um modo geral uma intensidade superior aos do W100, sugerindo que a digestão potencia a extração de compostos já existentes e leva à formação de novos.



**Figura 4.10** – Cromatogramas do pico base do WDig (azul) e do W100 (vermelho) obtidos por ESI em modo negativo (a) e positivo (b).

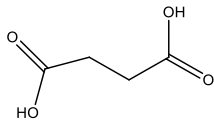
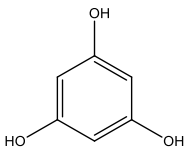
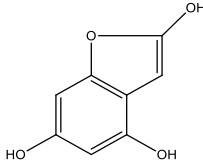
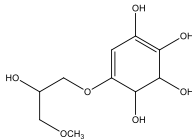
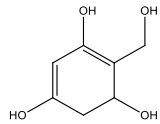
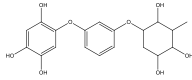
A análise dos BPCs do WDig permitiu identificar oito picos maioritários. Através da análise dos iões fragmento e com o auxílio das bases de dados MetFrag e m/zCloud foi possível proceder à identificação inequívoca de dois dos compostos. Esta é suportada pelos valores de massa precisas e respetivos erros. Na Figura 4.11 estão representados o ESI(+)-BPC (vermelho) e o ESI(-)-BPC (verde) do extrato digerido e na Tabela 4.1 está sumariada a informação de cada um dos picos. De referir que no caso do pico 3 a  $t_R = 2,1$  min não foi possível obter a informação sobre o  $MS^2$ .



**Figura 4.11** – Cromatogramas do pico base do WDig no ensaio LC-ESI(+)-MS/MS (vermelho) e LC-ESI(-)-MS/MS (verde).



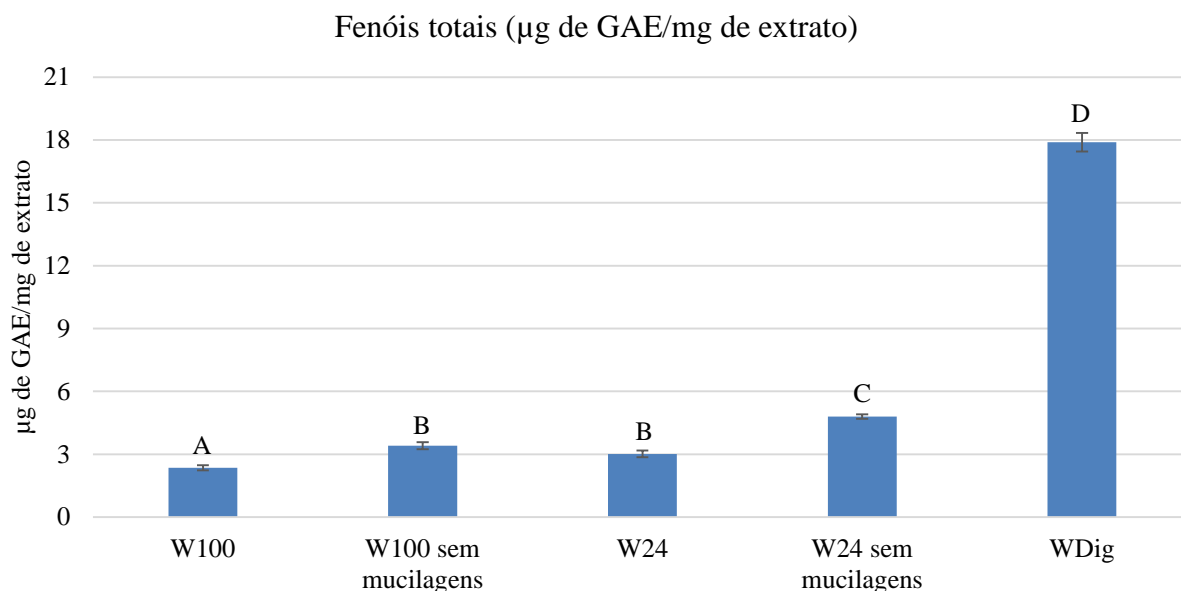
**Tabela 4.1** –Proposta de identificação (modo ESI negativo) dos compostos maioritários presentes no WDig de *U. pinnatifida*.

Pico	t <sub>R</sub> (min)	Fórmula Molecular	[M-H] <sup>-</sup> experimental m/z	Δ ppm	MS/MS iões fragmento [m/z (intensidade %)]	Hipóteses
1	1,9	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	180,0666	- 0,1	162 (14); 134 (25); 119 (69); 93 (59); 72 (100)	Tirosina
2	2,0	C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	117,0194	- 0,8	73 (100); 69 (16); 55 (10)	
3	2,1	C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub>	130,0875	- 1,1	-	-
	2,1	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	125,0359		t <sub>r</sub> idêntico ao padrão	
4	3,2	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>	164,0719	- 0,9	147 (15); 137 (18); 119 (14); 109 (12); 97 (100); 91 (13); 80 (44); 72 (51)	Fenilalanina
5	4,7	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	203,0826	- 0,1	142 (25); 116 (100); 74 (39); 72 (24)	Triptofano
6	5,5	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub>	165,0193	0,1	121 (60); 108 (13); 97 (100); 93 (23); 77(71)	
7	6,7	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>	247,0820	- 0,8	183 (14); 139 (13); 111 (27); 87 (100); 65 (25)	
8	6,9	C <sub>7</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	157,0508	- 1,2	112 (63); 105 (42); 103 (91); 97 (100); 71 (52); 69 (48)	
	6,9	C <sub>19</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>	377,0407		245 (100); 217(13); 175 (40); 145 (12); 141 (8); 129 (9)	

Dado não se ter encontrado nem nas bases de dados nem na bibliografia informação relativamente à identificação dos compostos de *U. pinnatifida* por LC-MS/MS, optou-se por fazer uma pesquisa de fragmentações que pudessem corresponder a moléculas do tipo florotaninos, tendo por base as indicações do *software DataAnalysis*. Os compostos propostos são derivados de floroglucinol, cuja presença se comprovou com a adição de padrão, aparecendo também moléculas do metabolismo primário das algas como aminoácidos e ácido succínico.

### 4.3 – Quantificação dos fenóis totais

Para a determinação dos fenóis totais recorreu-se ao método de Folin-Ciocalteu para cada uma das amostras, como foi descrito no ponto 3.7. Após realizados os cálculos, obteve-se o valor de fenóis totais que se encontram na Figura 4.12. Estes valores são apresentados como a média de três ensaios independentes e o desvio padrão associado às medições.



**Figura 4.12** - Comparação da quantidade dos fenóis totais dos diferentes extratos. Para cada valor, letras diferentes dizem respeito a amostras estatisticamente diferentes, com nível de confiança de 95 %.

Analisando os resultados obtidos, podemos observar uma maior quantidade de fenóis totais no extrato W24, quando o comparamos com W100, possivelmente por ser efetuada durante consideravelmente mais tempo e a temperatura mais adequada para tal ser mais baixa, podendo a cozedura comprometer a integridade dos compostos polifenólicos.

Existe uma diferença quando comparamos estes dois extratos prévios com e sem as mucilagens, pelo que obtemos um maior valor de fenóis totais nos extratos sem as mucilagens. Isto porque as mucilagens têm a capacidade de formar géis de água e de reter compostos desta forma. Consequentemente, alguma quantidade de fenóis poderá ficar retida nas mucilagens, não participando na reação. Logo, a quantidade de fenóis doseada será menor nos extratos com as mucilagens. Tal está de acordo com os resultados obtidos nos cromatogramas provenientes do HPLC-DAD, nos quais se verificou que se registava uma maior absorvência e, portanto, uma maior quantidade de compostos em ambos os extratos, W100 e W24, sem mucilagens.

Por último, a quantidade de fenóis foi também medida no extrato WDig, uma vez que no cromatograma proveniente do HPLC-DAD se registou o aparecimento de vários novos picos, ou seja, de novos compostos, bem como a absorvência no geral foi maior, significando uma maior quantidade dos compostos extraídos. Tendo em conta o aumento significativo da quantidade de fenóis totais para os outros extratos (cerca de cinco vezes, aproximadamente) podemos inferir que se tratam de fenóis que das outras maneiras não tinham sido extraídos, contribuindo assim para o resultado deste doseamento.

Comparando com o valor observado na literatura para a mesma alga ( $8,6 \pm 0,4$  µg de GAE/mg de extrato), este apresenta um valor cerca de duas vezes superior aos extratos sem a digestão, o que obteve maior quantidade foi o extrato de 24 h sem mucilagens ( $4,804 \pm 0,107$  µg de GAE/mg de

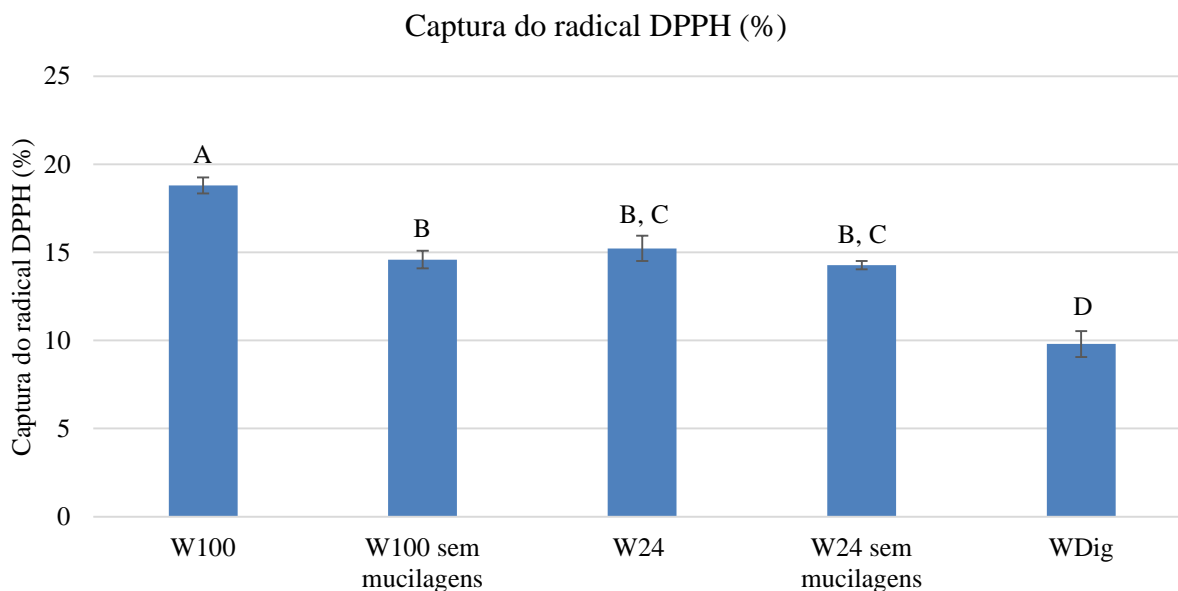
extrato). A melhor explicação para isto é que estas duas algas foram recolhidas em ecossistemas completamente diferentes que afetam as condições em que a alga vive e se reproduz, como tal também afetará a sua composição, quer em qualidade, quer em quantidade, logo a quantidade de fenóis será diferente. Ao comparar a *U. pinnatifida* com outras algas vemos que possui um dos menores teores em fenóis, tendo por exemplo a *Eisenia bicyclis* ( $192,6 \pm 3,3 \mu\text{g}$  de GAE/mg de extrato) ou a *Hizikia fusiformis* ( $34,5 \pm 5,8 \mu\text{g}$  de GAE/mg de extrato), ambas também algas castanhas<sup>94</sup>.

#### 4.4 – Determinação da atividade antioxidante

Os radicais livres e as espécies reativas que estes originam são responsáveis por diversas desvantagens a vários níveis, como por exemplo a degradação dos alimentos e o ataque aos nossos sistemas biológicos. Tendo isto em conta, os compostos fenólicos presentes em algas como *U. pinnatifida* são sabidos terem capacidades antioxidantes que contrariam a ação nociva dos radicais livres. Sendo assim, pretendemos estudar a capacidade dos polifenóis reduzir o radical DPPH para nos elucidar sobre a capacidade antioxidante desta alga.

##### 4.4.1 – Capacidade de redução do radical DPPH

Para a determinação da atividade antioxidante, segundo o método do DPPH, de cada amostra em estudo, recorreu-se ao procedimento descrito no ponto 3.8. Os resultados da percentagem de captura dos radicais livres estão presentes na Figura 4.13, para uma concentração final de 0,1 mg/mL. Estes valores são apresentados como a média de três ensaios independentes e o desvio padrão associado às medições.



**Figura 4.13** - Comparação das percentagens de captura do radical DPPH a uma concentração final de 0,1 mg/mL dos extratos. O padrão comercial quercetina apresenta um  $EC_{50}$  (mg/mL) de  $0,003 \pm 0,21$ . Para cada valor, letras diferentes dizem respeito a amostras estatisticamente diferentes, com nível de confiança de 95 %.

Analisando os resultados obtidos podemos observar que ao contrário da quantidade de fenóis totais, o extrato W100 possui uma atividade antioxidante ligeiramente superior ao do W24, embora tenha uma menor quantidade de fenóis totais. Com isto salienta-se a importância do tipo de fenóis

extraídos e não somente da quantidade, pois embora tenha uma menor quantidade de fenóis totais, W100 possui uma maior percentagem de captura do radical DPPH. Outra explicação para este resultado poderá ter a ver com a presença de outros compostos antioxidantes na alga marinha *U. pinnatifida*, como por exemplo a fucoxantina, a qual poderá sofrer uma melhor extração cozida a 100 °C, contribuindo deste modo para o aumento da atividade antioxidante.

O padrão comercial quercetina apresenta um valor de inibição muito superior ao dos extratos das algas. W100 à concentração de 0,1 mg/mL inibe aproximadamente 18 %, enquanto a quercetina com apenas 0,003 mg/mL inibe 50 %.

Contrariamente também à quantidade de fenóis totais, os extratos sem mucilagem apresentam uma menor percentagem de captura do radical DPPH. Isto, contudo, corrobora a observação feita anteriormente em que alguns dos fenóis ficam retidos nas mucilagens. Consequentemente, ao retirar as mucilagens retiramos também alguns fenóis, levando assim a uma diminuição da atividade antioxidante.

Por fim, a atividade antioxidante do extrato WDig revelou ter sido reduzida para metade. Está de acordo com os resultados prévios, uma vez que a concentração inicial foi 5 mg/mL e não 10 mg/mL como no caso dos outros extratos, pelo que faz todo o sentido que a percentagem de captura do radical DPPH seja metade, pois foi usada metade da concentração.

Comparando com a atividade antioxidante na literatura para a *U. pinnatifida* regista-se que, para a mesma concentração final de 0,1 mg/mL, a que nós obtivemos foi bastante superior (15 % vs 5 %). Mais uma vez, tal variação é explicada pelo ecossistema que rodeia a alga, bem como na diferença da extração da alga que, no nosso caso, foi feita com água e no caso oposto com solventes metanólicos. Em vista outras algas comestíveis já estudadas nota-se que a *U. pinnatifida* possui das menores atividades antioxidantes, tomando por exemplo a *S. fusiforme* que possui uma atividade cerca de quatro vezes superior<sup>95</sup>.

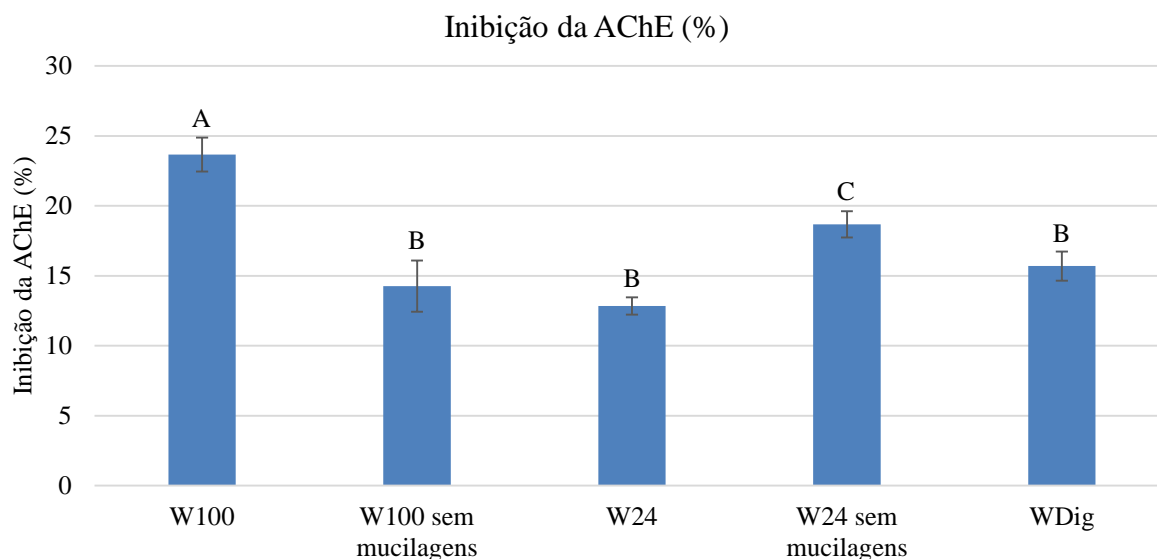
## 4.5 – Determinação da atividade enzimática

A inibição da AChE tem influência sobre os processos neurodegenerativos e sobre a motilidade gastrointestinal, dado que o enzima ao estar inibido não vai degradar a acetilcolina, logo o seu tempo de ação é superior. A HMGR é relevante, uma vez que interfere na síntese do colesterol, por conseguinte, ao estar inibida os níveis de colesterol serão inferiores. De facto, ambos os enzimas têm potencial impacto em doenças cardiovasculares. Nesta próxima fase do trabalho determinámos a capacidade de inibição enzimática da AChE e da HMGR.

### 4.5.1 – Inibição da acetilcolinesterase

A atividade inibitória da AChE foi avaliada, para as diferentes amostras em estudo, através do método descrito no ponto 3.9.1. É importante estudar esta atividade dado que, para além de ser um importante fator para as doenças neurodegenerativas, é de nota para o estudo do colesterol. De facto, a inibição deste enzima irá afetar a motilidade gastrointestinal, uma vez que ao inibir a ação do enzima que cessa o impulso nervoso, a ACh continua a atuar, aumentando assim a motilidade gastrointestinal, o que implica que o colesterol será mais dificilmente absorvido, sendo encaminhado para o fim do trato gastrointestinal.

Os resultados para a percentagem de inibição da AChE estão presentes na Figura 4.14, para uma concentração final de 1 mg/mL. Para cada uma das amostras foram feitas três medições independentes, estando os valores apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições.



**Figura 4.14** - Comparação dos valores obtidos da inibição da atividade enzimática dos diferentes extratos a uma concentração final de 1 mg/mL. O padrão comercial galantamina apresenta um  $IC_{50}$  (mg/mL) de  $0,0003 \pm 0,008$ . Para cada valor, letras diferentes dizem respeito a amostras estatisticamente diferentes, com nível de confiança de 95 %.

Quando observamos estes resultados notamos que, ao contrário do que sucedeu no caso dos fenóis e da atividade antioxidante, estes não seguem a mesma lógica. Por exemplo, o extrato W100 tem valor superior ao do mesmo extrato sem mucilagem. No entanto, o extrato W24 sem a mucilagem tem um valor superior ao extrato com mucilagem, o que contraria o resultado anterior.

A explicação mais plausível para este acontecimento penso que seja algo aleatório, associado a um erro, uma vez que a diferença entre os dois está no intervalo de erro previsto para este ensaio experimental. No que toca ao extrato WDig, seria esperado uma maior atividade inibitória da AChE devido ao aumento da quantidade de fenóis que foi observada, mas tal não foi o caso, estando aproximadamente na média dos outros extratos. Possivelmente, a qualidade dos fenóis adicionados nesta digestão não contribui para esta atividade biológica, mas pode ser que tenha efeitos positivos noutras atividades.

A determinação da inibição da AChE no extrato WDig foi efetuada duas vezes. Por um lado, recorreu-se ao uso de filtros para centrifugação com o intuito de retirar a pancreatina do extrato. Para tal foi efetuada a centrifugação a 12000 g durante 15 minutos. Após medir a atividade inibitória deste extrato vimos que esta era nula, pelo que concluímos que tal devia-se ao facto de, provavelmente, para além de a pancreatina ter sido filtrada, também os fenóis ficaram retidos no filtro, explicando este resultado. Consequentemente determinámos a atividade inibitória da AChE, mas desta vez não usámos o filtro para centrifugação, simplesmente centrifugámos a 10000 g durante 5 minutos para retirar a pancreatina e obtivemos o resultado apresentado na Figura 4.14.

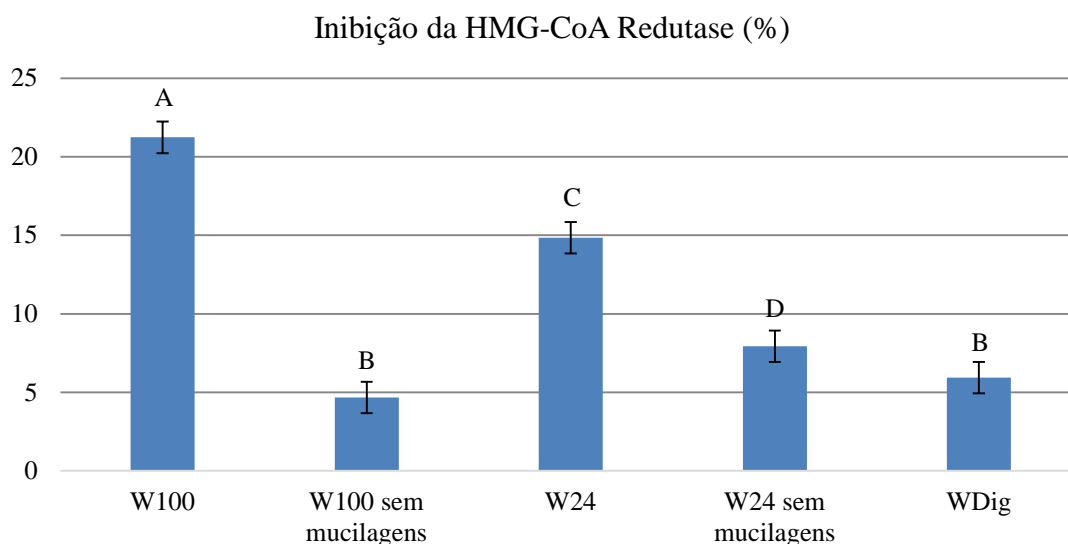
Mais uma vez, quando comparando a inibição dos extratos da alga com o padrão comercial galantamina notamos que é bastante inferior. Para o melhor extrato W100 à concentração de 1 mg/mL, obtivemos uma inibição de aproximadamente 24 %, enquanto a galantamina com apenas 0,0003 mg/mL tem a capacidade de inibir a AChE em 50 %.

Ao pesquisarmos na literatura, obtemos uma melhoria com os nossos resultados. No nosso estudo, o valor rondava os 15 % nos vários extratos a uma concentração final de 1 mg/mL quando comparado com um valor de  $-1,80 \pm 5,47$  com uma concentração final de 0,1 mg/mL para a mesma alga. Tal, como já foi explicado, dever-se-á a diferenças no ecossistema da alga. Ao comparar com outras algas do mesmo filo, vemos que *U. pinnatifida* possui menores valores de inibição com a

mesma concentração final, tomando por exemplo *Ecklonia stolonifera* com  $45,97 \pm 3,10$  % e *Ecklonia cava* com  $21,28 \pm 2,21$  % <sup>96</sup>.

#### 4.5.2 – Inibição da HMG-CoA Redutase

Neste ensaio avaliou-se a atividade inibitória da HMGR para as diferentes amostras, através do método descrito no ponto 3.9.2. Os resultados para a percentagem de inibição da HMGR estão presentes na Figura 4.15, para uma concentração final de 1 mg/mL.



**Figura 4.15** - Comparação dos valores obtidos de inibição da HMGR para os diferentes extratos a uma concentração final de 1 mg/mL. O padrão comercial sinvastatina apresenta um  $IC_{50}$  (mg/mL) de 0,0002 <sup>90</sup>. Para cada valor, letras diferentes dizem respeito a amostras estatisticamente diferentes, com nível de confiança de 95 %.

A partir dos resultados obtidos chegamos à conclusão de que retirar as mucilagens diminui em mais de metade a capacidade de inibição da HMGR, como visto nos dois extratos, nomeadamente no W100 e W24. Tendo em conta esta informação, podemos supor que alguns dos compostos mais ativos na inibição deste enzima se encontram nas mucilagens pelo que ao retirar as mucilagens a estes extratos a percentagem de inibição decresce.

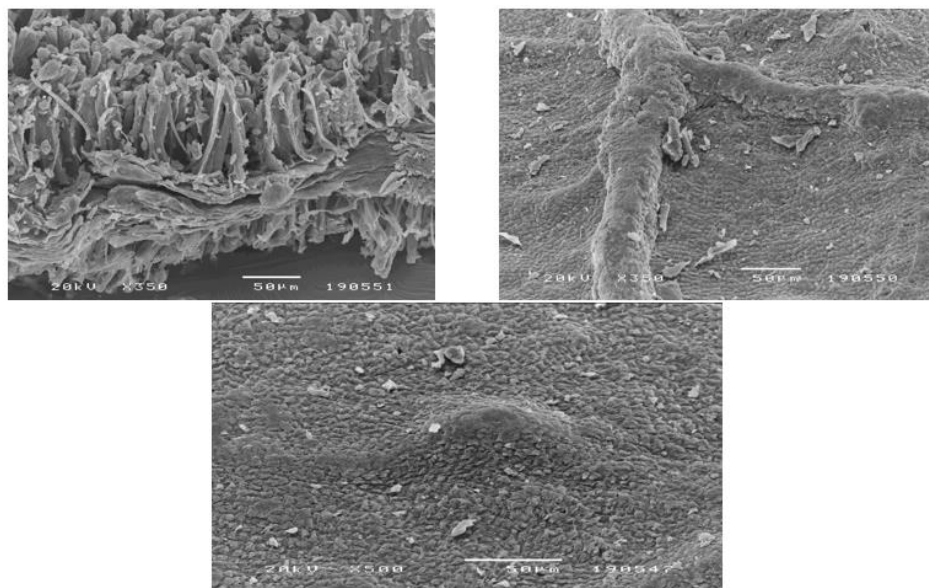
A maior diferença na percentagem de inibição do enzima é notoriamente no extrato WDig. Aparentemente, embora este extrato tenha sido capaz de extrair mais compostos da alga marinha *U. pinnatifida*, resultando no aumento na quantidade de fenóis totais, estes não possuem muita capacidade de inibir o enzima, pelo que possivelmente a digestão estará a ter algum impacto na capacidade dos fenóis entrarem no centro ativo do enzima e, desta forma, possui um menor efeito nesta atividade biológica.

Ao comparar o melhor extrato W100 com o padrão comercial sinvastatina, reparamos novamente numa capacidade de inibição da HMGR bastante inferior. Com a concentração de 1 mg/mL W100 inibe aproximadamente 22 %, ao passo que a sinvastatina apenas com 0,0002 mg/mL inibe 50 %.

Pesquisando na literatura, chegamos à conclusão que *U. pinnatifida* não possui uma elevada inibição da HMGR, uma vez que extratos polifenólicos de outra alga castanha, nomeadamente *Ecklonia cava*, possuem uma inibição de 78%, com uma concentração de 0,005 mg/mL, demonstrando ter uma atividade inibitória bastante superior <sup>97</sup>.

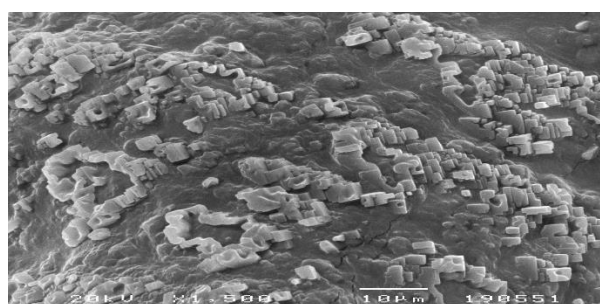
#### 4.6 – Análise por Microscopia Eletrônica de Varrimento

Para uma melhor compreensão da estrutura morfológica de *U. pinnatifida* e para se estudar se os diversos processos de extração, tais como a cozedura e a digestão, influenciam ou modificam os compostos presentes, realizou-se uma microscopia eletrônica de varrimento, cujo procedimento de análise está descrito no ponto 3.10.



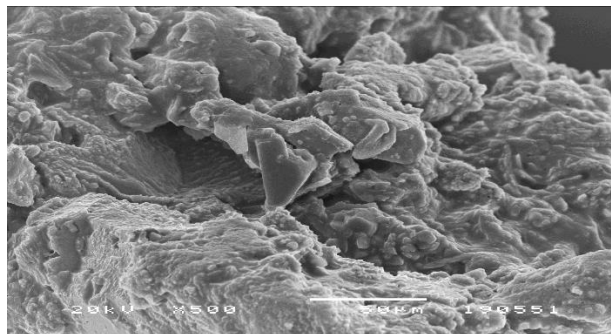
**Figura 4.16** – Imagem do SEM da estrutura inicial da alga liofilizada.

Na figura 4.16 podemos observar a estrutura microscópica da alga liofilizada antes de sofrer qualquer processo biológico ou químico. Importante salientar as vilosidades facilmente observáveis que se encontram na imagem superior esquerda, bem como no filamento na imagem superior direita. Na imagem inferior observa-se bem o tipo de relevo rugoso que a superfície de *U. pinnatifida* apresenta.



**Figura 4.17** – Imagem do SEM do extrato W100.

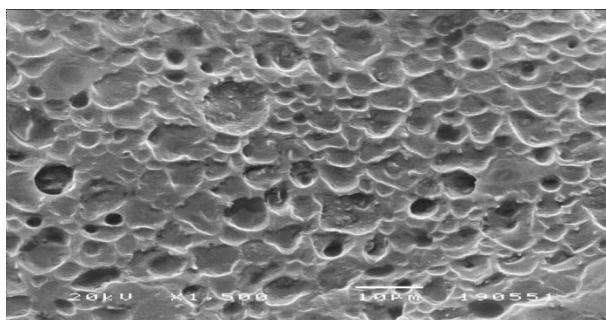
Na figura 4.17 é claro o aparecimento de umas novas estruturas em forma cúbica e/ou de paralelepípedo, que não existiam na figura 4.16, além de que as vilosidades e os filamentos desapareceram. De salientar que, ao contrário da figura anterior, a qual era a matéria da própria alga, esta é do extrato dessa mesma alga cozida a 100 °C, na qual se recolheu o sobrenadante e liofilizou-se, sendo esse material liofilizado que aqui se observa. O aparecimento destas novas estruturas será provavelmente devido à cozedura da alga, que terá permitido a sua extração.



**Figura 4.18** – Imagem do SEM do extrato W100 sem mucilagens.

Na figura 4.18 observamos o mesmo extrato daquele presente na figura 4.16, no qual foram retiradas as mucilagens. Também neste o sobrenadante foi recolhido e liofilizado sendo este que se observa.

A alteração mais notável é que, ao contrário da alga liofilizada e do extrato W100 (com mucilagens), nesta a superfície é bastante irregular e repleta de orifícios. Não se observa também nenhuma das estruturas previamente observadas e mencionadas. Uma possível explicação é que as estruturas em forma de paralelepípedo vistas no extrato W100 eram polissacáridos, uma vez que ao retirar as mucilagens estes desapareceram.



**Figura 4.19** – Imagem do SEM do extrato WDig.

Na figura 4.19 registamos uma grande alteração da estrutura e superfície que terá sido resultado da digestão. Neste caso existem estruturas com forma mais esférica que não existem em mais nenhuma amostra. Poderemos, então, supor que são polifenóis dado que os resultados obtidos pelo HPLC-DAD e quantidade de fenóis totais mostram um incremento dos mesmos.

Concluindo esta parte do trabalho experimental das atividades biológicas chegámos à conclusão de que o melhor extrato é o W100 com mucilagens. Possui a maior inibição da HMGR e da AChE. Adicionalmente tem a maior percentagem de captura do radical DPPH com uma menor quantidade de fenóis totais, indicando a sua superior atividade antioxidante.

De salientar também o que ocorreu a *U. pinnatifida* quando sujeita a uma digestão de 24 horas com suco pancreático (WDig), a qual foi possível extrair novos compostos e em maior quantidade, como pudemos observar nos cromatogramas pelo aparecimento de novos picos e uma maior intensidade dos mesmos. Embora tenha tido um grande aumento na quantidade de fenóis totais, as bioatividades não melhoraram proporcionalmente como se esperaria, continuando o extrato W100 com melhores atividades biológicas.



## 4.7 – Ensaios em linhas celulares do carcinoma do colon humano

Durante este trabalho experimental realizaram-se ensaios *in vitro* em células do carcinoma do colón humano (Caco-2), uma vez que se pretende estudar a possível influência de *U. pinnatifida* na permeação do colesterol e do fármaco ezetimibe. Para tal, começou por se estudar a citotoxicidade dos extratos pelo método do MTT e, posteriormente, realizaram-se ensaios preliminares que visaram estudar a influência dos extratos de *U. pinnatifida*, do colesterol e do ezetimibe no perfil proteico da linha celular Caco-2, efetuando-se a eletroforese bidimensional para tal objetivo.

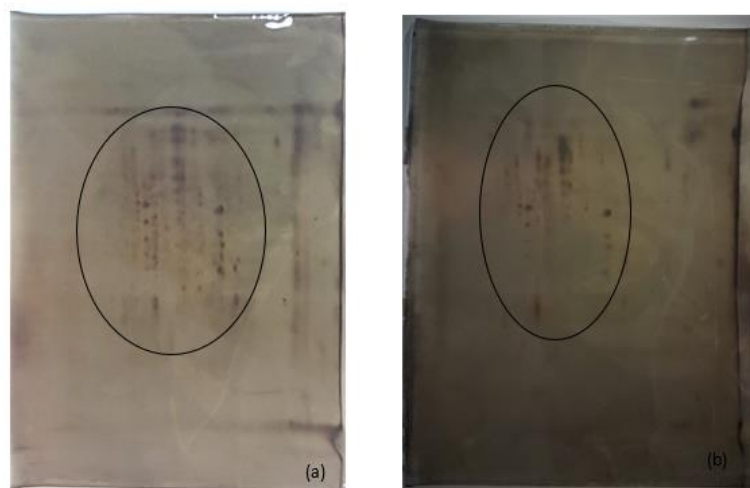
### 4.7.1 – Determinação da citotoxicidade em células Caco-2

Foi estudado o potencial citotóxico do extrato que obteve os melhores resultados nos prévios doseamentos, nomeadamente da atividade antioxidante (quantificação de fenóis totais e capacidade de redução do radical DPPH) e inibição da AChE e HMGR, W100, com e sem mucilagens, bem como W24, também com e sem mucilagens. Tal foi avaliado em células Caco-2, que permitem mimetizar as células do intestino, onde ocorre grande parte da absorção dos vários compostos da alga. Para os quatro extratos analisou-se a citotoxicidade a uma concentração de 0,1 mg/mL e 0,5 mg/mL. Os ensaios foram feitos em triplicados. Após se realizar o ensaio três vezes, tendo obtido sempre valores que rondavam os 100 %, concluiu-se que os extratos nas concentrações referidas não apresentam citotoxicidade, podendo até serem capazes de promover o crescimento celular, o que justifica as percentagens acima dos 100 %. Tal já era o esperado, dado que a alga *U. pinnatifida* é consumida em abundância há vários anos, particularmente na comunidade asiática, sem nunca ter sido registado nenhum problema.

Tendo em conta os estudos de citotoxicidade com células Caco-2 reportados na literatura, podemos relacionar o trabalho aqui desenvolvido com o reportado por Khanavi *et al.* usando também algas castanhas, tais como *Sagassum swartzii*, *Cystoseira myrica* e *Colpomenia sinuosa*. Nestes casos, o valor de concentração que representa 50 % de inibição (IC<sub>50</sub>) para os extratos metanólicos (equivalente ao sem mucilagem) é superior a 1 mg/mL, demonstrando dessa forma a muito baixa citotoxicidade que estas algas marinhas apresentam<sup>98</sup>.

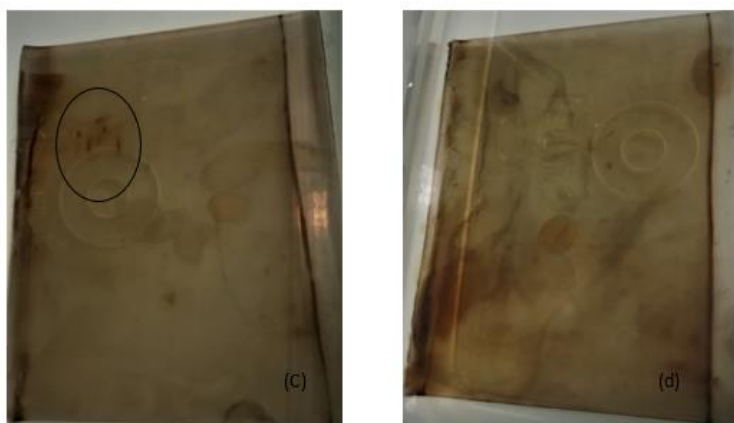
### 4.7.2 – Eletroforese bidimensional

Com o objetivo de avaliar se ocorrem modificações no perfil proteico da linha celular Caco-2 quando exposta aos diversos extratos de *U. pinnatifida* em junção com o colesterol e o fármaco ezetimibe, que diminui os níveis de colesterol, realizou-se uma eletroforese bidimensional cujo procedimento experimental está descrito nos pontos 3.11.2 e 3.11.3.



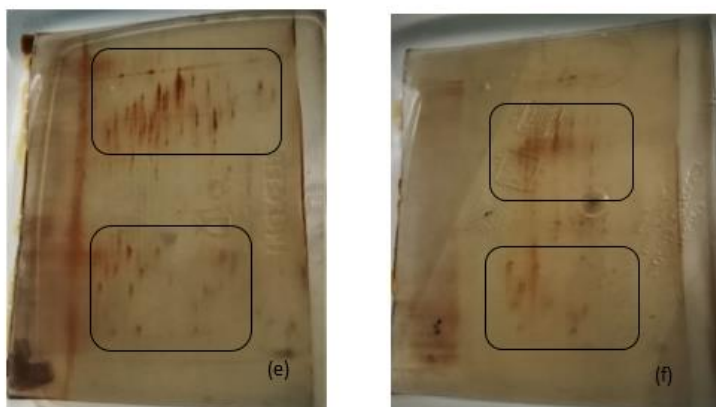
**Figura 4.20** – (a) Imagem do gel de eletroforese bidimensional das células Caco-2 com colesterol; (b) Imagem do gel de eletroforese bidimensional das células Caco-2 com colesterol + ezetimiba

Analisando estes dois géis na Figura 4.20, os quais foram usados como controlo, notamos que na imagem (a) existe uma maior quantidade de proteínas do que na imagem (b). Tal poderá dever-se ao facto de que como o ezetimiba é um fármaco que atua reduzindo o nível de colesterol e, ao interagirem, a ação do colesterol sobre as células estará diminuída.



**Figura 4.21** – (c) Imagem do gel de eletroforese bidimensional das células Caco-2 com colesterol + alga liofilizada; (d) Imagem do gel de eletroforese bidimensional das células Caco-2 com colesterol + WDig

Nas duas imagens expostas na Figura 4.21, vemos uma grande modificação ao nível do perfil proteico, registando-se uma drástica diminuição da quantidade proteica comparando com o que vimos na Figura 4.20. No caso da imagem (c), a amostra em causa é a alga liofilizada pelo que não foram extraídos nenhuns compostos, sendo provavelmente essa a razão do decréscimo observado. No caso da imagem (d), o extrato em questão é WDig pelo que, embora com este processo tenhamos conseguido extrair mais compostos como vimos no cromatograma presente na Figura 4.6, a digestão terá desnaturado as proteínas explicando assim a pouca quantidade ou mesmo a falta de proteínas observadas no gel.



**Figura 4.22** – (e) Imagem do gel de eletroforese bidimensional das células Caco-2 com colesterol + W100; (f) Imagem do gel de eletroforese bidimensional das células Caco-2 com colesterol + ezetimiba + W100

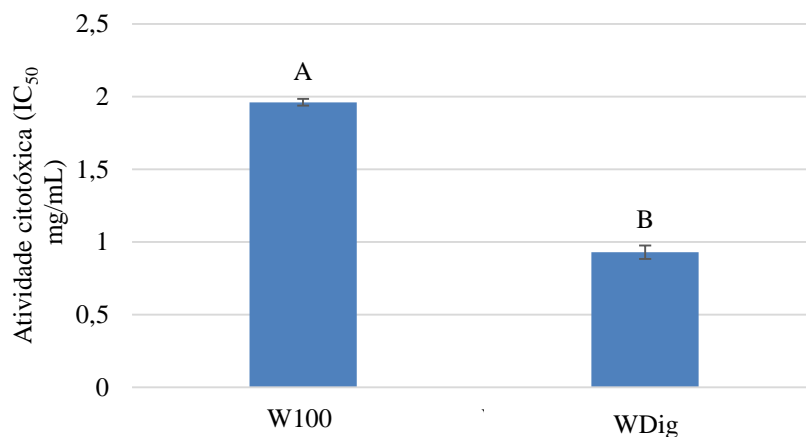
Por último, na Figura 4.22 vemos a ação do extrato W100. Mais uma vez observa-se uma grande alteração do perfil proteico, havendo um grande aumento da quantidade proteica quando comparado com os géis presentes quer na Figura 4.20, quer na Figura 4.21. Este extrato é o que obteve os melhores resultados de atividade biológica pelo que podemos postular que este perfil proteico poderá ter tido alguma influência nisso. É importante salientar ainda que, tal como ocorreu na Figura 4.20, quando temos o colesterol em junção com o ezetimiba ocorre uma diminuição da quantidade proteica, a qual se registou novamente aqui, mesmo com a interação simultânea com o extrato W100.

#### 4.8 – Ensaios em linhas celulares do carcinoma hepatocelular humano

Durante este trabalho experimental realizaram-se ensaios *in vitro* em células do carcinoma hepático humano (Hep-G2) para se estudar a possível influência dos extratos de *U. pinnatifida*. Para tal, iniciou-se por estudar a citotoxicidade dos extratos pelo método do MTT e, posteriormente, realizaram-se ensaios preliminares que visaram estudar a influência dos extratos de *U. pinnatifida* no perfil proteico da linha celular Hep-G2, recorrendo-se à normalização pela quantidade de proteína para a realização da eletroforese SDS-PAGE.

##### 4.8.1 – Determinação da citotoxicidade em células Hep-G2

Foi estudado o potencial citotóxico de dois extratos, nomeadamente W100 e WDig. A cada um dos extratos viu-se a citotoxicidade às concentrações de 0,1; 0,2 e 0,5 mg/mL, tendo sido possível, por extrapolação, determinar o IC<sub>50</sub> para todos os extratos. Para cada um foram feitas três microplacas e os valores estão apresentados como a média e o desvio padrão associado às medições.



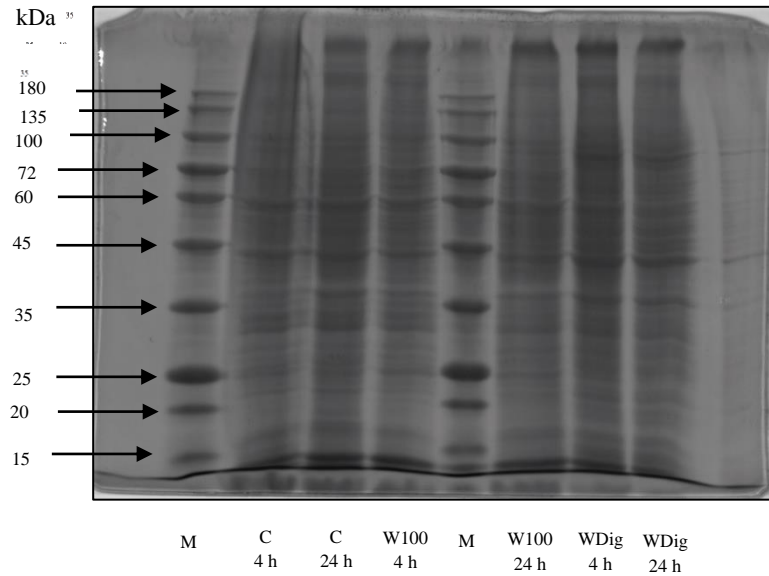
**Figura 4.23** – Valores de IC<sub>50</sub> para os extratos em estudo. Para cada valor, letras diferentes dizem respeito a amostras estatisticamente diferentes, com nível de confiança de 95 %.

Analisando os resultados obtidos conclui-se que os extratos não são citotóxicos, dado que concentrações superiores a 0,1 mg/mL não são consideradas tóxicas para células humanas quando se usa extratos de plantas e derivados <sup>99</sup>. No Anexo 3 encontram-se os perfis citotóxicos das células quando em contacto com ambos os extratos, sendo visível o aumento da citotoxicidade quando se aumenta a dosagem. O importante de salientar na figura 4.23 é o aumento da citotoxicidade quando é efetuada a digestão de 24 horas com suco pancreático. Verifica-se, aproximadamente, que é necessário apenas cerca de metade da concentração para obter a mesma resposta. Isto deve-se provavelmente ao facto de que, após a digestão, foram extraídos mais compostos e em maior quantidade, o que poderá contribuir para a citotoxicidade do extrato.

Na literatura não se encontra estudos feitos da citotoxicidade de algas, recorrendo ao método do MTT, em células Hep-G2. Contudo, encontram-se estudos efetuados em outras células cancerígenas, como as previamente usadas Caco-2, bem como HT-29 (células do cancro do cólon) e MCF-7 (células do cancro mamário), nas quais os valores de IC<sub>50</sub> são superiores a 1 mg/mL para as algas castanhas *Sagassum swartzii*, *Cystoseira myrica* e *Colpomenia sinuosa* <sup>98</sup>. Comparando com os valores obtidos para W100 e WDig, podemos considerar que W100 tem uma citotoxicidade notoriamente baixa, pois o seu IC<sub>50</sub> é mais elevado. Em relação a WDig, embora o extrato não seja citotóxico, apresenta um valor de IC<sub>50</sub> menor que W100, ou seja, é um extrato com um maior potencial citotóxico.

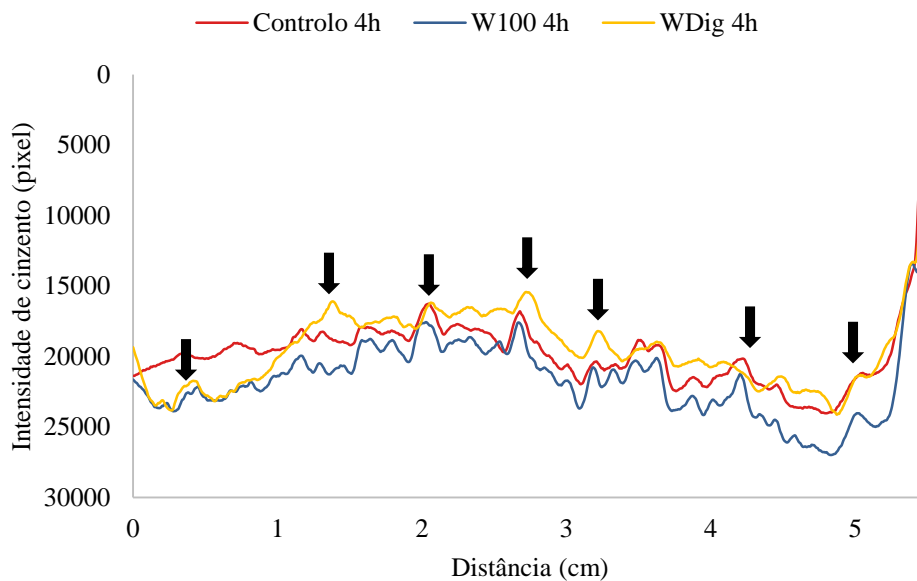
#### 4.8.2 – Eletroforese em gel de poliacrilamida unidimensional

Para se estudar a ação dos extratos de *U. pinnatifida* no perfil proteico nas células Hep-G2 realizou-se uma eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE). Obtivemos assim um eletroforegrama (Figura 4.24), no qual conseguimos analisar as subunidades polipeptídicas, com o intuito de saber se os extratos induzem de facto alterações a nível da expressão proteica. Efetuámos um estudo no qual deixámos as amostras em contacto com as células durante 4 horas, pois esse é o tempo aproximado da digestão, e outro durante 24 horas, para ter em conta os fatores do efeito cumulativo e do trânsito intestinal.



**Figura 4.24** – Análise eletroforética desnaturante (SDS-PAGE), normalizada pela quantidade das proteínas totais de células Hep-G2: M – Marcador de peso molecular; C 4 h e C 24 h – Expressão proteica das células expostas apenas a meio de cultura durante 4 e 24 horas, respetivamente; W100 4 h e W100 24 h – Expressão proteica das células expostas ao extrato W100 durante 4 e 24 horas, respetivamente; WDig 4 h e WDig 24 h – Expressão proteica das células expostas ao extrato WDig 4 e 24 horas, respetivamente.

Ao analisar o eletroforegrama obtido, observa-se que nos dois extratos em estudo, nomeadamente W100 e WDig, quer seja 4 horas ou 24 horas, a expressão proteica foi semelhante. No entanto, a intensidade das bandas de cada um dos poços difere dependendo das condições a que as células estiveram sujeitas. A comparação entre as diferentes intensidades das bandas foi possibilitada pelo uso do programa *ImageJ*, que permitiu obter a intensidade de cada banda para o controlo e os diferentes extratos.



**Figura 4.25** – Gráfico da intensidade (*pixel*) de cada banda obtida no gel de eletroforese, normalizado pela quantidade de proteína, em função da distância percorrida (cm) para as células controlo, em contacto com W100 e com WDig durante 4 horas.

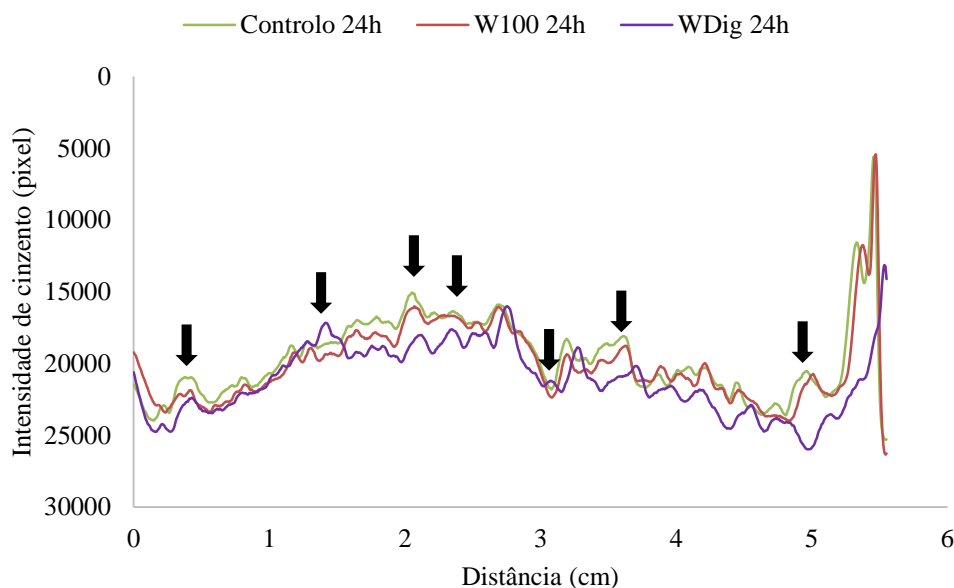
Analisando o resultado obtido na Figura 4.25, observamos que o perfil proteico para as diferentes amostras é bastante semelhante. Contudo, possui diferenças que correspondem a alterações do perfil proteico, as quais estão assinaladas por setas. As modificações podem ocorrer de duas maneiras distintas. A nível qualitativo, na qual o gráfico apresenta um pico de intensidade que não se regista nas outras amostras, e a nível quantitativo, na qual regista-se uma diferença na intensidade de cinzento. Consequentemente, em seguida analisou-se a intensidade das bandas através do cálculo das suas áreas para se saber com maior precisão e exatidão as alterações que ocorreram. Por fim, sabendo as distâncias de migração a que ocorreram estas diferenças e com recurso à equação presente no Anexo 4, calculou-se o peso molecular das bandas.

**Tabela 4.2** - Valores da distância percorrida (cm), peso molecular (kDa) e da área das bandas correspondentes às proteínas das células em contacto com o meio (controlo), com W100 e com o WDig durante 4 horas.

Distância (cm)	PM (kDa)	Área das bandas (u.a.)		
		Controlo 4 h	W100 4 h	WDig 4 h
0,5	148,43	329	253	608
1,4	93,52	95	265	441
2,1	65,29	646	831	298
2,7	47,99	585	558	396
3,2	37,12	158	276	532
4,3	21,11	760	649	271
5,0	14,74	192	591	215

Tendo em conta os dados obtidos, verificamos que não ocorreram modificações ao nível qualitativo, apenas ao nível quantitativo. No geral, as alterações não foram bruscas passadas estas 4 horas. Observando-se o gráfico da Figura 4.25 e a Tabela 4.2, verifica-se que a quantidade de proteína é superior no W100, mostrando que este extrato poderá ter fatores que estimulem a expressão proteica. Contrariamente, o extrato WDig apresenta uma menor quantidade de proteína do que o controlo e tal poderá dever-se ao facto de que quando se efetuou a digestão algumas proteínas poderão ter desnaturado.

Efetuuou-se o mesmo tratamento de resultados descrito previamente para as amostras em contacto com as células 24 horas.



**Figura 4.26** – Gráfico da intensidade (*pixel*) de cada banda obtida no gel de eletroforese, normalizado pela quantidade de proteína, em função da distância percorrida (cm) para as células controlo, em contacto com W100 e com WDig durante 24 horas.

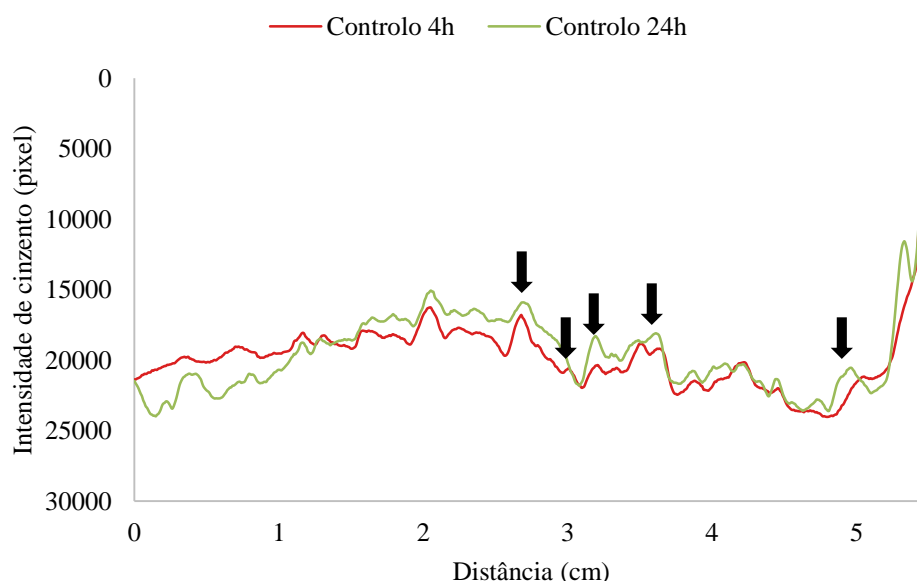
**Tabela 4.3** - Valores da distância percorrida (cm), peso molecular (kDa) e da área das bandas correspondentes às proteínas das células em contacto com o meio (controlo), com W100 e com o WDig durante 24 horas.

Distância (cm)	PM (kDa)	Área das bandas (u.a.)		
		Controlo 24 h	W100 24 h	WDig 24 h
0,4	156,25	759	387	706
1,4	93,52	185	195	714
2,1	65,29	494	448	574
2,4	55,98	120	213	456
3,1	39,08	0	0	79
3,6	30,23	1173	712	1103
5,0	14,74	842	633	348

Analisando os resultados obtidos na Figura 4.26 e os dados da Tabela 4.3, registamos uma diferença ao nível qualitativo, o qual não aconteceu quando sujeitamos as células às amostras durante apenas 4 horas. À distância aproximada de 3,1 cm (39,08 kDa) existe uma banda que só se verifica nas células em contacto com WDig. Tal é indicativo que o contacto prolongado por 24 horas induziu uma alteração na expressão proteica das células Hep-G2, as quais expressam uma proteína que não se regista quer quando o contacto se resume a 4 horas, quer no contacto com o extrato W100.

Por outro lado, a nível quantitativo verifica-se novamente uma modificação para o que ocorria com as células em contacto com as amostras durante 4 horas. Desta vez, as células em contacto WDig apresentam a maior quantidade de proteína, seguido de W100 e depois o controlo. Ou seja, as células quando estão em contacto com WDig durante um período superior a 4 horas sofrem um aumento da

expressão proteica. Em relação às células em contacto com W100 e com o meio no controlo, permanece o resultado observado anteriormente e o esperado que é a quantidade proteica das de W100 é superior às do controlo.



**Figura 4.27** – Gráfico da intensidade (*pixel*) de cada banda obtida no gel de eletroforese, normalizado pela quantidade de proteína, em função da distância percorrida (cm) para as células controlo 4 e 24 horas.

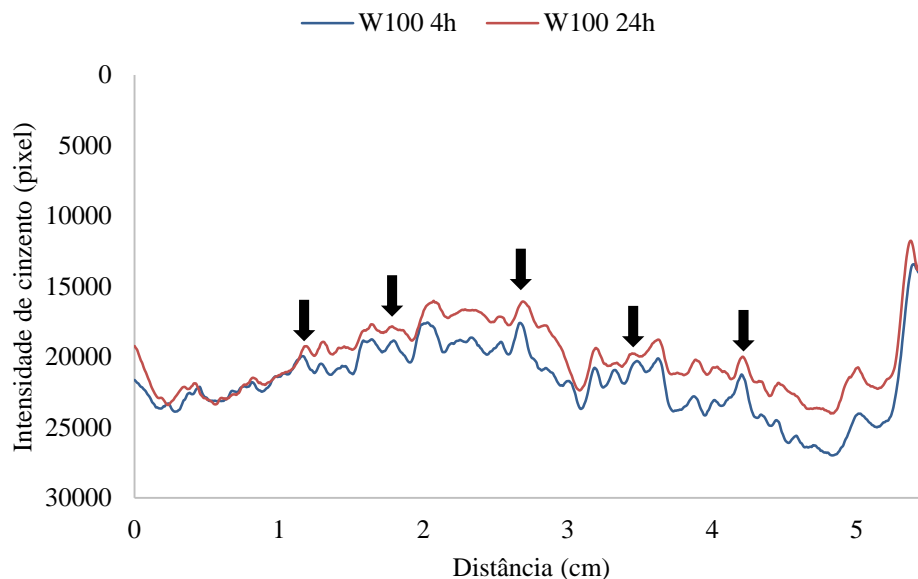
**Tabela 4.4** - Valores da distância percorrida (cm), peso molecular (kDa) e da área das bandas correspondentes às proteínas das células em contacto com o meio (controlo) 4 e 24 horas.

Distância (cm)	PM (kDa)	Área das bandas (u.a.)	
		Controlo 4 h	Controlo 24 h
2,8	45,59	584	381
3,0	41,14	86	0
3,1	39,08	192	402
3,7	28,72	349	350
5,0	14,74	324	849

Tendo em conta os resultados obtidos na Figura 4.27 e os dados fornecidos pela Tabela 4.4, salienta-se a existência de uma banda à distância de 3,0 cm (41,14 kDa) que só existe nas células controlo de 4 h, não aparecendo no controlo de 24 h. Isto poderá ser devido a uma proteína que desnaturou com o passar das horas dado possivelmente não serem as condições adequadas à sua homeostasia.

Em relação à quantidade proteica, embora no gráfico disposto na Figura 4.27 não seja muito esclarecedor, quando vemos as áreas das bandas na Tabela 4.4 notamos um aumento da mesma no controlo de 24 horas o que seria esperado, pois a expressão proteica não cessa e por essa razão há um aumento do número de proteínas.



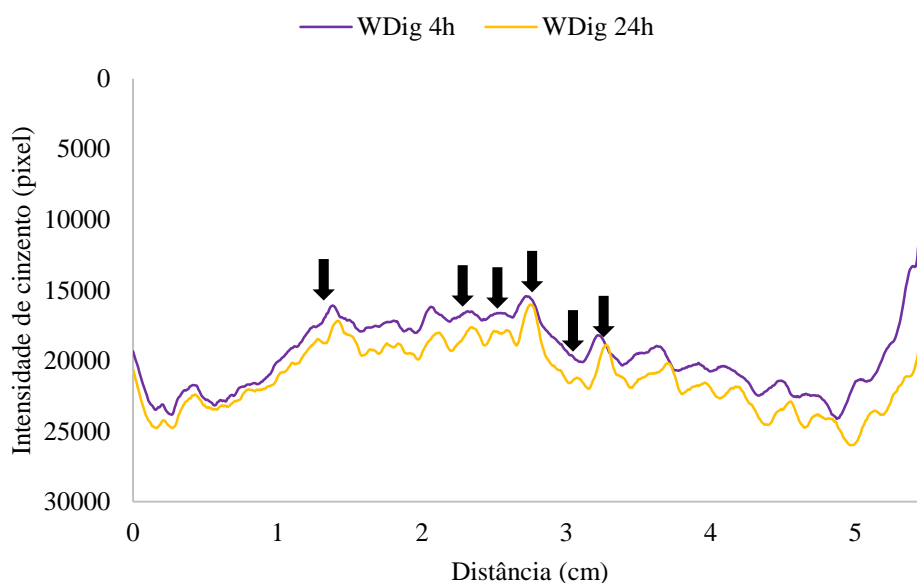


**Figura 4.28** – Gráfico da intensidade (*pixel*) de cada banda obtida no gel de eletroforese, normalizado pela quantidade de proteína, em função da distância percorrida (cm) para as células com o extrato W100 4 e 24 horas.

**Tabela 4.5** - Valores da distância percorrida (cm), peso molecular (kDa) e da área das bandas correspondentes às proteínas das células em contacto com o extrato W100 4 e 24 horas.

Distância (cm)	PM (kDa)	Área das bandas (u.a.)	
		W100 4 h	W100 24 h
1,2	103,63	260	102
1,9	72,35	257	114
2,8	45,59	598	308
3,4	33,50	173	8
4,3	21,11	638	227

Analisando os resultados obtidos na Figura 4.28 e os dados na Tabela 4.5 vemos que este extrato W100 contraria o resto, não acontecendo o esperado. Verifica-se que com o contacto prolongado das células com W100, a quantidade proteica diminui de forma significativa. Isto sugere que embora o extrato tenha uma citotoxicidade baixa tem um efeito sobre as proteínas, altera a sua expressão causando uma diminuição.



**Figura 4.29** – Gráfico da intensidade (*pixel*) de cada banda obtida no gel de eletroforese, normalizado pela quantidade de proteína, em função da distância percorrida (cm) para as células com o extrato WDig 4 e 24 horas.

**Tabela 4.6** - Valores da distância percorrida (cm), peso molecular (kDa) e da área das bandas correspondentes às proteínas das células em contacto com o extrato WDig 4 e 24 horas.

Distância (cm)	PM (kDa)	Área das bandas (u.a.)	
		WDig 4 h	WDig 24 h
1,4	93,52	472	814
2,4	55,98	166	501
2,5	53,18	90	385
2,8	45,59	639	1417
3,1	39,08	0	96
3,3	93,52	540	1211

Tendo em conta os resultados obtidos na Figura 4.29 e os dados obtidos na Tabela 4.6, é notório o aumento da quantidade de proteína nas células em contacto com o extrato WDig durante 24 horas. Existe portanto um aumento da expressão proteica um pouco acima do esperado ao comparar com as células controlo, logo podemos suspeitar que este extrato potencia de alguma forma a expressão das proteínas. Para além disto, à distância 3,1 cm (39,08 kDa) aparece uma banda na WDig 24 h que não se registava na WDig 4 h. Entende-se então que além de possivelmente potenciar o aumento da quantidade de proteína também altera a sua expressão.

Outro ponto de salientar foi que ao realizar o procedimento experimental indicado no ponto 3.12.3 as células soltaram-se do fundo apenas quando em contacto com o extrato WDig, às 4 e 24 horas, por isso, o extrato terá algum composto que afeta as proteínas de adesão da linha celular Hep-G2.

Concluindo esta parte do trabalho experimental chegamos à conclusão de que os extratos não são citotóxicos para as concentrações normalmente ingeridas desta alga, tanto em células Caco-2 como em células Hep-G2, verificando-se, contudo, um aumento da citotoxicidade para o extrato WDig.

A nível do perfil proteico, observámos a ocorrência de modificações do mesmo dando novo discernimento para o facto de que ao variar o método de extração a composição dos extratos altera, alterando consequentemente o proteoma celular, quando em contacto com as células.

#### 4.9 – Discussão global

O processo de extração da alga *Undaria pinnatifida*, semelhante a preparações alimentares, revelou que a utilização de água à temperatura de ebulição, semelhante a uma preparação do tipo “sopa”, contém maior número de compostos fenólicos, bem como metabolitos primários, aminoácidos e ácido succínico.

Em extratos de algas como *Fucus spp* da costa portuguesa<sup>100,101</sup>, foram encontrados florotaninos de elevada massa molecular, que não apareceram neste trabalho. Esta diferença poderá ser devida a uma alga de diferente espécie e, por outro lado, ao diferente ambiente onde a alga do presente trabalho foi apanhada.

Verificou-se também que, no caso de as algas serem ingeridas em forma de saladas, isto é, desidratadas, será digerida principalmente no intestino através de enzimas como a pancreatina. Esta degradação enzimática fará aparecer compostos como florotaninos, porém este aumento de fenóis totais não se traduz num aumento das atividades inibitórias dos enzimas estudados no presente trabalho.

Os extratos obtidos nas diferentes condições demonstraram ter alguma atividade antioxidante, principalmente W100, no entanto um pouco inferior ao descrito na bibliografia<sup>95</sup>. Este facto pode dever-se à presença nos nossos extratos de polissacáridos, tais como alginatos, que no presente trabalho não foram retirados.

No que respeita às atividades inibitórias da AChE e HMGR, verificámos que são inferiores às indicadas noutras preparações alimentares, como infusões<sup>89</sup>. Se bem que na sua composição existam florotaninos, os compostos fenólicos estão em menor quantidade do que no caso destas infusões. Por outro lado, aumentando a quantidade de fenóis, como no WDig, a atividade inibitória não aumentou, o que leva a supor que grande parte desta atividade encontrada no W100 poderá ser devida a componentes não fenólicos como polissacáridos que possam bloquear o centro ativo do enzima.

No que respeita à alteração do proteoma celular, verificou-se que tanto o ezetimiba como o próprio extrato das algas produzem alterações no proteoma das células, quer das Caco-2, quer das Hep-G2. Estas alterações também já foram verificadas com infusões, estando alguma destas alterações proteicas relacionadas com processos de cancerização<sup>89,102</sup>.



## **5 – CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS**



Nesta dissertação sobre *U. pinnatifida*, com o trabalho laboratorial que foi desenvolvido, permitiu chegar à conclusão de que possui as atividades biológicas interessantes e esperadas, tendo em conta toda a informação presente na literatura.

Após a obtenção dos quatro extratos iniciais, nomeadamente W100 com e sem mucilagens e W24 com e sem mucilagens, verificou-se que o extrato que obteve melhores atividades biológicas foi o W100 com mucilagens. Contudo, mesmo tendo sido o melhor extrato, as suas atividades não são alvo de relevância quando se comparam com as bioatividades que se registam para outras algas e plantas. Para tentar entender a diferença entre as bioatividades dos diferentes extratos, as amostras foram analisadas por HPLC. Contudo, este não foi esclarecedor, visto que os cromatogramas obtidos eram bastante idênticos, levando-nos à conclusão de que a diferença entre as bioatividades reside na qualidade dos compostos em si e não na quantidade ou na presença de algum composto que não existiria noutros extratos.

Com o intuito de verificar se a alga quando sofre o processo de digestão mantém as suas bioatividades ou se estas sofrem alterações, efetuou-se a digestão com suco pancreático e com suco gástrico durante 4 e 24 horas e estas amostras foram também analisadas por HPLC. No cromatograma obtido no extrato sujeito à digestão de 24 horas com suco pancreático, verificou-se o aparecimento de novos picos, indicando novos compostos extraídos, bem como uma maior intensidade dos picos, significando uma maior quantidade. Face a estes resultados foi-se medir as atividades biológicas deste extrato. Verificou-se um grande aumento na quantidade de fenóis totais o que pode explicar o aparecimento de novos picos no cromatograma. No entanto, as bioatividades obtiveram valores inferiores ao extrato W100.

Tentando identificar alguns dos compostos responsáveis pelas melhores bioatividades de *U. pinnatifida* no extrato W100 e dos novos picos que apareceram no extrato WDig analisaram-se ambas as amostras recorrendo ao LC-MS. Chegou-se à conclusão de que a alga possui aminoácidos como a tirosina e o triptofano em maiores quantidades e possivelmente florotaninos, como o floroglucinol, os quais foram reportadas existirem nesta alga na literatura.

Quando se analisaram as amostras por microscopia eletrónica de varrimento revelou-se uma mudança na morfologia da alga quando se variava o método de extração.

Mostrou-se também que *U. pinnatifida* não é citotóxica, quer em células Caco-2, quer em células Hep-G2, sendo que no caso do extrato WDig denota-se um aumento na citotoxicidade de praticamente duas vezes. Ao estudar o perfil proteico dos vários extratos revelaram-se mais uma vez algumas diferenças quando se altera o método de extração, salientando-se assim a relevância do mesmo.

Em suma, com base nos resultados obtidos nesta dissertação, *U. pinnatifida* é uma alga que traz benefícios para a saúde humana. Embora não tenha tido os melhores resultados, quando comparada a fármacos e outras algas, não nos podemos esquecer que *U. pinnatifida* faz parte da alimentação do dia-a-dia e, como tal, também não poderia ter inibições enzimáticas e certas atividades biológicas muito elevadas, caso contrário seria prejudicial. Desta forma consegue-se atingir um equilíbrio no nosso organismo.

## Conclusão e perspectivas futuras

Com o trabalho experimental desenvolvido ao longo desta dissertação tentou-se abranger as áreas mais promissoras a estudar de *U. pinnatifida*. Tomando em consideração os resultados obtidos seria importante realizar mais alguns estudos, nomeadamente:

- Realizar estudos de permeação do colesterol com os diferentes extratos em células Caco-2 para melhor entender o impacto que a alga tem no combate a doenças derivadas da obesidade, como por exemplo as doenças cardiovasculares;
- Identificar as proteínas que apareceram na eletroforese unidimensional quando as células estiveram em contacto com o extrato durante 24 horas;
- Analisar as diferenças a nível do perfil proteico dos diferentes extratos obtidos na eletroforese bidimensional;
- Identificar os novos compostos extraídos da alga quando se realizou a digestão de 24 horas com suco pancreático por espectrometria de massa;
- Estudar se os compostos fenólicos existentes possuem a capacidade de atravessar a membrana celular;
- Determinar as atividades biológicas após se retirar os alginatos.



## **Referências Bibliográficas**



1. Fung, A., Hamid, N. & Lu, J. Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida*. *Food Chem.* **136**, 1055–1062 (2013).
2. Dawczynski, C., Schäfer, U., Leiterer, M. & Jahreis, G. Nutritional and Toxicological Importance of Macro, Trace, and Ultra-Trace Elements in Algae Food Products. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 10470–10475 (2007).
3. Murata, M., Ishihara, K. & Saito, H. Hepatic Fatty Acid Oxidation Enzyme Activities Are Stimulated in Rats Fed the Brown Seaweed, *Undaria pinnatifida* (Wakame). *J. Nutr.* **129**, 146–151 (1999).
4. Li, Y. X. & Kim, S. K. Utilization of seaweed derived ingredients as potential antioxidants and functional ingredients in the food industry: An overview. *Food Sci. Biotechnol.* **20**, 1461–1466 (2011).
5. Wang, T. *et al.* Antioxidant capacities of phlorotannins extracted from the brown algae *Fucus vesiculosus*. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 5874–5883 (2012).
6. Macartain, P., Gill, C. I. R., Brooks, M., Campbell, R. & Rowland, I. R. Nutritional Value of Edible Seaweeds. *Nutr. Rev.* **65**, 535–543 (2007).
7. Brown, E. M. *et al.* Seaweed and human health. *Nutr. Rev.* **72**, 205–216 (2014).
8. Grasa-López, A. *et al.* *Undaria pinnatifida* and fucoxanthin ameliorate lipogenesis and markers of both inflammation and cardiovascular dysfunction in an animal model of diet-induced obesity. *Mar. Drugs* **14**, 1–21 (2016).
9. Hata, Y., Nakajima, K., Uchida, J. ichi, Hidaka, H. & Nakano, T. Clinical effects of brown seaweed, *Undaria pinnatifida* (wakame), on blood pressure in hypertensive subjects. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **30**, 43–53 (2001).
10. Jiménez-Escrig, A., Jiménez-Jiménez, I., Pulido, R. & Saura-Calixto, F. Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds. *J. Sci. Food Agric.* **81**, 530–534 (2001).
11. Terasaki, M. *et al.* Evaluation of recoverable functional lipid components of several brown seaweeds (phaeophyta) from Japan with special reference to fucoxanthin and fucosterol contents. *J. Phycol.* **45**, 974–980 (2009).
12. Valdés, L. *et al.* The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: Impact on human health. *Food Funct.* **6**, 2424–2439 (2015).
13. Heo, S. J., Park, E. J., Lee, K. W. & Jeon, Y. J. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresour. Technol.* **96**, 1613–1623 (2005).
14. Tierney, M. S. *et al.* Enrichment of polyphenol contents and antioxidant activities of Irish brown macroalgae using food-friendly techniques based on polarity and molecular size Michelle. *Food Chem.* **139**, 753–761 (2013).
15. Wijesekara, I., Kim, S. K., Li, Y. & Li, Y. X. Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochem.* **46**, 2219–2224 (2011).
16. Gómez-Guzmán, M., Rodríguez-Nogales, A., Algieri, F. & Gálvez, J. Potential role of seaweed polyphenols in cardiovascular-associated disorders. *Mar. Drugs* **16**, 1–21 (2018).
17. Vo, T. S. & Kim, S. K. Potential anti-HIV agents from marine resources: An overview. *Mar. Drugs* **8**, 2871–2892 (2010).
18. Hwang, J. A. *et al.* Seamustard (*Undaria pinnatifida*) improves growth, immunity, fatty acid profile and reduces cholesterol in hanwoo steers. *Asian-Australasian J. Anim. Sci.* **27**, 1114–1123 (2014).
19. Wan-Loy, C. & Siew-Moi, P. Marine algae as a potential source for anti-obesity agents. *Mar.*

- Drugs* **14**, 1–19 (2016).
20. Senevirathne, M. *et al.* Antioxidant potential of *Oecklonia cava* on reactive oxygen species scavenging, metal chelating, reducing power and lipid peroxidation inhibition. *Food Sci. Technol. Int.* **12**, 27–38 (2006).
  21. Shibata, T., Ishimaru, K., Kawaguchi, S., Yoshikawa, H. & Hama, Y. Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese Laminariaceae. *J. Appl. Phycol.* **20**, 255–261 (2007).
  22. Wang, T., Jónsdóttir, R. & Ólafsdóttir, G. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chem.* **116**, 240–248 (2009).
  23. Maeda, H., Tsukui, T., Sashima, T., Hosokawa, M. & Miyashita, K. Seaweed carotenoid, fucoxanthin, as a multi-functional nutrient. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **17**, 196–199 (2008).
  24. Miyashita, K. *et al.* The allenic carotenoid fucoxanthin, a novel marine nutraceutical from brown seaweeds. *J. Sci. Food Agric.* **91**, 1166–1174 (2011).
  25. Woo, M. N. *et al.* Anti-obese property of fucoxanthin is partly mediated by altering lipid-regulating enzymes and uncoupling proteins of visceral adipose tissue in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* **53**, 1603–1611 (2009).
  26. Kang, S. I. *et al.* *Petalonia binghamiae* extract and its constituent fucoxanthin ameliorate high-fat diet-induced obesity by activating AMP-activated protein kinase. *J. Agric. Food Chem.* **60**, 3389–3395 (2012).
  27. Woo, M. N. *et al.* Fucoxanthin supplementation improves plasma and hepatic lipid metabolism and blood glucose concentration in high-fat fed C57BL/6N mice. *Chem. Biol. Interact.* **186**, 316–322 (2010).
  28. Draget, K. I. & Taylor, C. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocoll.* **25**, 251–256 (2011).
  29. Mackie, A. R. *et al.* Sodium alginate decreases the permeability of intestinal mucus. *Food Hydrocoll.* **52**, 749–755 (2016).
  30. Idota, Y. *et al.* Cholesterol-lowering effect of calcium alginate in rats. *Biol. Pharm. Bull.* **39**, 62–67 (2016).
  31. J.F., M. Mucilaginous Plants and their uses in medicine. *J. Ethnopharmacol.* **29**, 245–266 (1990).
  32. Balke, D. T. & Diosady, L. L. Rapid aqueous extraction of mucilage from whole white mustard seed. *Food Res. Int.* **33**, 347–356 (2000).
  33. Assi, O. *et al.* Characterization of the mucilages of four food plants, *Abelmoschus esculentus*, *Beilschmiedia mannii*, *Corchorus olitorius*, and *Irvingia gabonensis*, from Côte d'Ivoire. *Biotechnol. J. Int.* **19**, 1–10 (2017).
  34. Persson, T., Popescu, B. O. & Cedazo-Minguez, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: Why did antioxidant therapy fail? *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2014**, (2014).
  35. Riley, P. A. Free radicals in biology: Oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* **65**, 27–33 (1994).
  36. Poljsak, B., Šuput, D. & Milisav, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2013**, 1–11 (2013).
  37. Gandhi, S. & Abramov, A. Y. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2012**, 1–11 (2012).
  38. Headlam, H. A. & Davies, M. J. Markers of protein oxidation: Different oxidants give rise to variable yields of bound and released carbonyl products. *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 1175–1184

- (2004).
39. Zhu, X., Su, B., Wang, X., Smith, M. A. & Perry, G. Causes of oxidative stress in Alzheimer disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **64**, 2202–2210 (2007).
  40. Musiek, E. S. & Morrow, J. D. F2 -Isoprostanes as Markers of Oxidant Stress: An Overview. *Curr. Protoc. Toxicol.* **10**, 1–10 (2005).
  41. Yousri, R., Noaman, E., Shawi, O. El, Fahmy, N. & Ghazy, M. Evaluation of Anti-Oxidant Status and Radioprotective Activity of a Novel Anti-Cancer Drug in Mice. *J. Cancer Ther.* **2**, 616–628 (2011).
  42. Witztum, J. L. & Steinberg, D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* **88**, 1785–1792 (1991).
  43. Feng, Y. & Wang, X. Antioxidant therapies for Alzheimer's disease. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2012**, 1–17 (2012).
  44. Lott, I. T. *et al.* Down Syndrome and Dementia: A Randomized, Controlled Trial of Antioxidant Supplementation. *Am. J. Med. Genet. Part A* **155**, 1939–1948 (2011).
  45. Sequeira, S., Rao, A. V. & Rao, A. Increased oxidative stress and altered antioxidants status in patients with chronic allergic rhinitis. *Adv. Biosci. Biotechnol.* **3**, 951–956 (2012).
  46. Sardas, S. The role of antioxidants in cancer prevention and treatment. *Indoor Built Environ.* **12**, 401–404 (2003).
  47. Cheeseman, K. H. & Slater, T. F. An introduction to free radical biochemistry. *Br. Med. Bull.* **49**, 481–493 (1993).
  48. Willett, W. C. The Mediterranean diet: science and practice. *Public Health Nutr.* **9**, 105–110 (2006).
  49. Athiperumalsami, T., Rajeswari, V. D., Poorna, S. H., Kumar, V. & Jesudass, L. L. Antioxidant activity of seagrasses and seaweeds. *Bot. Mar.* **53**, 251–257 (2010).
  50. Shanura Fernando, I. P., Kim, M., Son, K. T., Jeong, Y. & Jeon, Y. J. Antioxidant Activity of Marine Algal Polyphenolic Compounds: A Mechanistic Approach. *J. Med. Food* **19**, 1–14 (2016).
  51. Pisoschi, A. M. & Pop, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur. J. Med. Chem.* **97**, 55–74 (2015).
  52. Colovic, M. B., Krstic, D. Z., Lazarevic-Pasti, T. D., Bondzic, A. M. & Vasic, V. M. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Curr. Neuropharmacol.* **11**, 315–335 (2013).
  53. Chacko, L. W. & Cerf, J. Histochemical localization of cholinesterase in the amphibian spinal cord and alterations following ventral root section. *J. Anat.* **94**, 74–81 (1960).
  54. Daniel, Q. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition states. *Chem. Rev.* **87**, 955–979 (1987).
  55. Taylor, P. & Radic, Z. The cholinesterases: from genes to proteins. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **34**, 281–320 (1994).
  56. Manavalan, P., Taylor, P. & Curtis Johnson, W. Circular dichroism studies of acetylcholinesterase conformation. Comparison of the 11 S and 5.6 S species and the differences induced by inhibitory ligands. *Biochim. Biophys. Acta* **829**, 365–370 (1985).
  57. Nachmansohn, D. & Wilson, I. B. The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine. *Adv. Enzymol. Relat. Subj. Biochem.* **12**, 259–339 (1951).
  58. Ordentlich, A. *et al.* Dissection of the Human Acetylcholinesterase Active Center

- Determinants of Substrate Specificity. *J. Biol. Chem.* **268**, 17083–17095 (1993).
59. Tougu, V. Acetylcholinesterase: Mechanism of Catalysis and Inhibition. *Curr. Med. Chem. Nerv. Syst. Agents* **1**, 155–170 (2005).
60. Perry, E., Walker, M., Grace, J. & Perry, R. Acetylcholine in mind: A neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends Neurosci.* **22**, 273–280 (1999).
61. Ariel, N. *et al.* The ‘aromatic patch’ of three proximal residues in the human acetylcholinesterase active centre allows for versatile interaction modes with inhibitors. *Biochem. J.* **335**, 95–102 (1998).
62. Sussman, J. L. *et al.* Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. *Science* (80-. ). **253**, 872–879 (1991).
63. Edwards, P. A. & Ericsson, J. Sterols and Isoprenoids: Signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 157–185 (1999).
64. Willnow, T. E. The low-density lipoprotein receptor gene family: Multiple roles in lipid metabolism. *J. Mol. Med.* **77**, 306–315 (1999).
65. Goldstein, J. L. & Brown, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* **343**, 425–430 (1990).
66. Ross, S. D. *et al.* Clinical outcomes in statin treatment trials: A meta-analysis. *Arch. Intern. Med.* **159**, 1793–1802 (1999).
67. Horton, J. D., Goldstein, J. L. & Brown, M. S. SREBPs: Activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J. Clin. Invest.* **109**, 1125–1131 (2002).
68. Hanukoglu, I. Steroidogenic enzymes: Structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **43**, 779–804 (1992).
69. Maxfield, F. R. & Tabas, I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* **438**, 612–621 (2005).
70. Wilson, M. D. & Rudel, L. L. Review of cholesterol absorption with emphasis on dietary and biliary cholesterol. *J. Lipid Res.* **35**, 943–955 (1994).
71. Dietschy, J. M., Turley, S. D. & Spady, D. K. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J. Lipid Res.* **34**, 1637–1659 (1993).
72. Kruit, J. K., Groen, A. K., van Berkel, T. J. & Kuipers, F. Emerging roles of the intestine in control of cholesterol metabolism. *World J. Gastroenterol.* **12**, 6429–6439 (2006).
73. Wang, L. J. & Song, B. L. Niemann-Pick C1-Like 1 and cholesterol uptake. *Biochim. Biophys. Acta* **1821**, 964–972 (2012).
74. Bonamassa, B. & Moschetta, A. Atherosclerosis: Lessons from LXR and the intestine. *Trends Endocrinol. Metab.* **24**, 120–128 (2013).
75. Van Der Velde, A. E., Brufau, G. & Groen, A. K. Transintestinal cholesterol efflux. *Curr. Opin. Lipidol.* **21**, 167–171 (2010).
76. Haslam, D., Sattar, N. & Lean, M. ABC of obesity. Obesity - time to wake up. *Br. Med. J.* **333**, 640–642 (2006).
77. Kannel, W., Castelli, W. & Gordon, T. Cholesterol in the Prediction of Atherosclerotic Disease. *Ann. Intern. Med.* **90**, 85 (1979).
78. Pihlajamäki, J., Gylling, H., Miettinen, T. A. & Laakso, M. Insulin resistance is associated with increased cholesterol synthesis and decreased cholesterol absorption in normoglycemic men. *J. Lipid Res.* **45**, 507–512 (2004).

79. Krauss, R. M. Lipids and lipoproteins in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* **27**, 1496–1504 (2004).
80. Di Cesare, M. *et al.* Trends in adult body-mass index in 200 countries from 1975 to 2014: A pooled analysis of 1698 population-based measurement studies with 19.2 million participants. *Lancet* **387**, 1377–1396 (2016).
81. Henriques, J. *et al.* Valorization of kiwifruit production: leaves of the pruning branches of *Actinidia deliciosa* as a promising source of polyphenols. *Eur. Food Res. Technol.* **243**, 1343–1353 (2017).
82. Agbor, G. A., Vinson, J. A. & Donnelly, P. E. Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *Int. J. Food Sci. Nutr. Diet.* **3**, 147–156 (2014).
83. Cilla, A., González-Sarrías, A., Tomás-Barberán, F. A., Espín, J. C. & Barberá, R. Availability of polyphenols in fruit beverages subjected to in vitro gastrointestinal digestion and their effects on proliferation, cell-cycle and apoptosis in human colon cancer Caco-2 cells. *Food Chem.* **114**, 813–820 (2009).
84. Porfírio, S. *et al.* Antiacetylcholinesterase and antioxidant activities of *Plectranthus barbatus* tea, after in vitro gastrointestinal metabolism. *Food Chem.* **122**, 179–187 (2010).
85. Khadhri, A. *et al.* In vitro digestion, antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of two species of ruta: *Ruta chalepensis* and *Ruta montana*. *Pharm. Biol.* **55**, 101–107 (2016).
86. Frasco, M. F., Fournier, D., Carvalho, F. & Guilhermino, L. Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity. *Biomarkers* **10**, 360–375 (2005).
87. Lee, C. H. *et al.* Antioxidant activity of brown soybean ethanolic extracts and application to cooked pork patties. *Korean J. Food Sci. Anim. Resour.* **36**, 359–368 (2016).
88. Saleem Ali-Shtayeh, M. *et al.* In-vitro screening of acetylcholinesterase inhibitory activity of extracts from Palestinian indigenous flora in relation to the treatment of Alzheimer's disease. *Funct. Foods Heal. Dis.* **4**, 381–400 (2014).
89. Falé, P. L. *et al.* Acetylcholinesterase inhibition, antioxidant activity and toxicity of *Peumus boldus* water extracts on HeLa and Caco-2 cell lines. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 2656–2662 (2012).
90. Falé, P. L. *et al.* Evaluation of cholesterol absorption and biosynthesis by decoctions of *Annona cherimola* leaves. *J. Ethnopharmacol.* **150**, 718–723 (2013).
91. Ressaissi, A. *et al.* Isorhamnetin derivatives and piscidic acid for hypercholesterolemia: cholesterol permeability, HMG-CoA reductase inhibition, and docking studies. *Arch. Pharm. Res.* **40**, 1278–1286 (2017).
92. Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W. & Villanueva, Á. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochem.* **114**, 785–796 (2012).
93. Yan, J. X. *et al.* A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization- mass spectrometry. *Electrophoresis* **21**, 3666–3672 (2000).
94. Machu, L. *et al.* Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Molecules* **20**, 1118–1133 (2015).
95. Moon, S. H., Jo, J. H., Kye, I. S., Huh, M. K. & Major, T. DPPH radical scavenging activity effect of edible seaweeds for noodles. *Eur. J. Pharm. Med. Res.* **4**, 32–37 (2017).

## Referências Bibliográficas

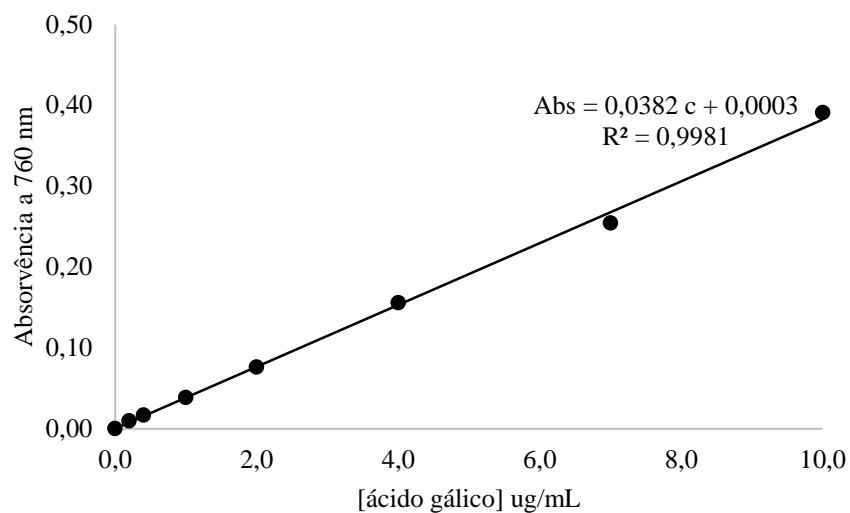
96. Yoon, N. Y., Chung, H. Y., Kim, H. R. & Choi, J. S. Acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory activities of sterols and phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. *Fish. Sci.* **74**, 200–207 (2008).
97. Yeo, A. R. *et al.* Anti-hyperlipidemic effect of polyphenol extract (Seapolynol<sup>TM</sup>) and dieckol isolated from *ecklonia cava* in in vivo and in vitro models. *Prev. Nutr. Food Sci.* **17**, 1–7 (2012).
98. Khanavi, M. *et al.* Cytotoxic activity of some marine brown algae against cancer cell lines. *J. Biol. Res.* **43**, 31–37 (2010).
99. Okonogi, S., Duangrat, C., Anuchpreeda, S., Tachakittirungrod, S. & Chowwanapoonpohn, S. Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chem.* **103**, 839–846 (2007).
100. Lopes, G. *et al.* Profiling phlorotannins from *Fucus* spp. of the Northern Portuguese coastline: Chemical approach by HPLC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> and UPLC-ESI-QTOF/MS. *Algal Res.* **29**, 113–120 (2018).
101. Catarino, M. D., Silva, A. M. S., Mateus, N. & Cardoso, S. M. Optimization of phlorotannins extraction from *fucus vesiculosus* and evaluation of their potential to prevent metabolic disorders. *Mar. Drugs* **17**, (2019).
102. Henriques, J., Falé, P. L., Pacheco, R., Florêncio, M. H. & Serralheiro, M. L. Phenolic compounds from *Actinidia deliciosa* leaves: Caco-2 permeability, enzyme inhibitory activity and cell protein profile studies. *J. King Saud Univ. - Sci.* **30**, 513–518 (2018).



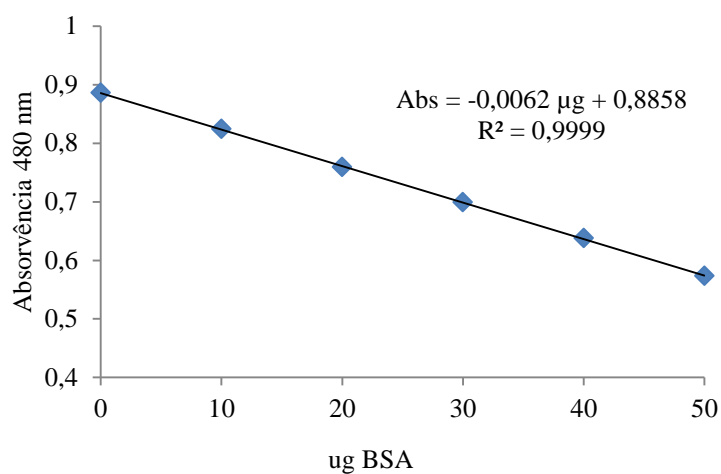
**Anexos**



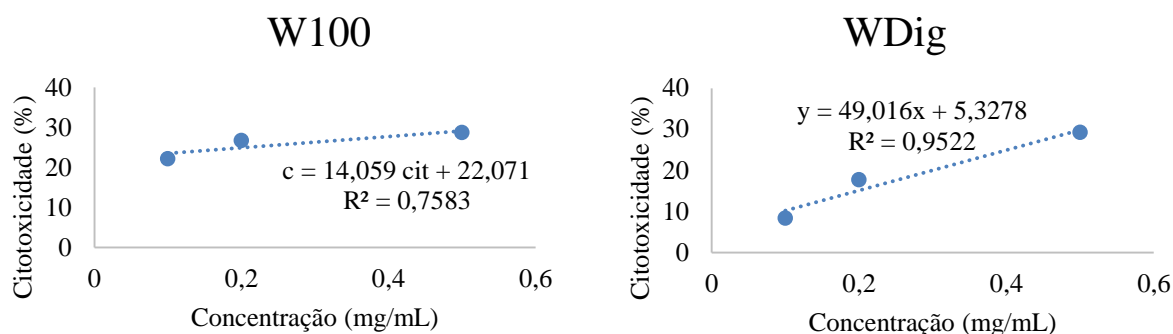
**Anexo 1:** Reta de calibração dos fenóis totais, onde *Abs* diz respeito à absorvência a 760 nm e *c* à concentração de ácido gálico (µg/mL)



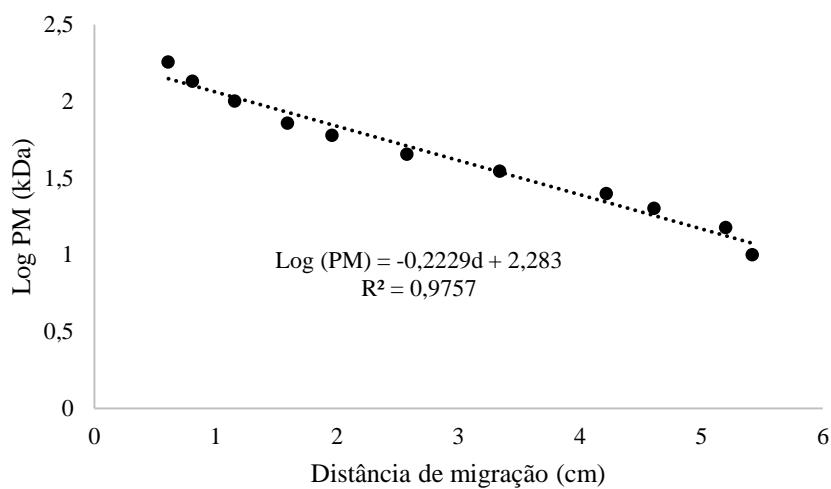
**Anexo 2:** Reta de calibração da quantificação proteica, onde *Abs* diz respeito à absorvência a 480 nm e µg à massa de BSA

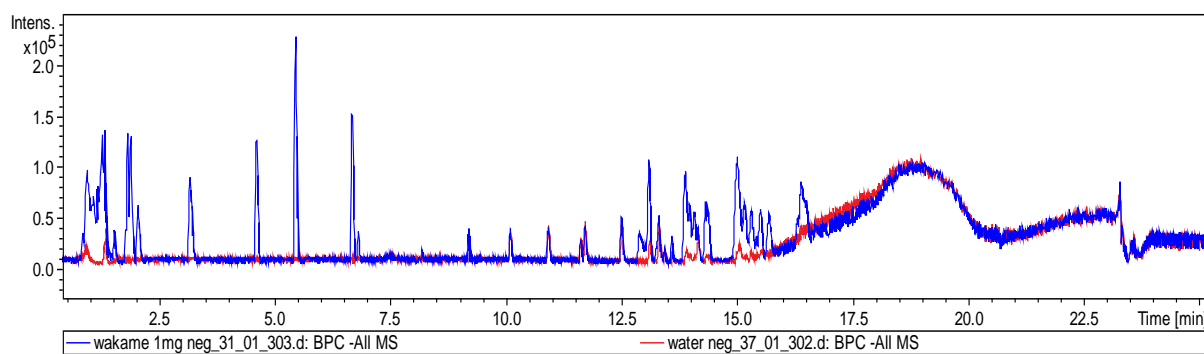


**Anexo 3:** Perfis citotóxicos em linhas celulares Hep-G2 para os extratos W100 e WDig, onde  $c$  representa a concentração, em mg/mL, e  $cit$  diz respeito à citotoxicidade, em percentagem



**Anexo 4:** Perfil eletroforético (em linha celular Hep-G2) para o marcador de peso molecular onde  $PM$  diz respeito ao peso molecular em kDa e  $d$  à distância de migração em cm



**Anexo 5:** Cromatograma de LC-MS comparando WDig em modo negativo com a água.**Anexo 6:** Cromatograma de LC-MS comparando WDig em modo positivo com a água.